



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA β -LAPACHONA EM MODELO
DE SEPSE E *IN VITRO***

ANA LÍGIA DE BRITO OLIVEIRA

BELÉM-PA

2018



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA β -LAPACHONA EM MODELO
DE SEPSE E *IN VITRO***

Autora: Ana Lígia de Brito Oliveira

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 Para como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área: Fármacos e medicamentos. Linha de Pesquisa: Avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos.

BELÉM-PA

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Lígia de Brito Oliveira

Avaliação do efeito imunomodulador da β -lapachona em modelo de sepse e *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Para como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

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

Prof. Dra. Patrícia Dutra Sauzem
Instituição: Universidade Federal do Pampa/UNIPAMPA

Prof. Dra. Marciene Ataíde de Andrade
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

BELÉM-PA

2018

DEDICATÓRIA

À Deus, que sempre foi o autor da minha vida e do meu destino;
À minha família pelo apoio incondicional e constante incentivo;
À minha orientadora por acreditar que eu era capaz e pela orientação;
Aos meus amigos ganhei no grupo Labeim, em especial ao grupo Imuno por se disponibilizarem a contribuir com o presente estudo.

EPÍGRAFE

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Autor: Albert Einstein

RESUMO

OLIVEIRA, A. L. B. AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA β -LAPACHONA EM MODELO DE SEPSE E *IN VITRO*. f.85. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018

Sepse é uma resposta inflamatória sistêmica decorrente de uma infecção e falha na resposta imune do hospedeiro. Apesar dos tratamentos atuais, a sepse continua sendo umas das principais causas de morte em UTI. Assim, se torna necessário a pesquisa por novas terapias para o controle da infecção. A β -lapachona é uma orto-naftoquinona obtida a partir da casca de *Tabebuia avellanedae* conhecida por sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória por meio da imunomodulação. Neste estudo, foi avaliado o efeito de β -lapachona sobre a infecção polimicrobiana induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Camundongos swiss foram divididos em 4 grupos pré e pós tratados, sendo que um deles apenas recebeu o procedimento cirúrgico sem indução de CLP (Sham). Os demais receberam por via intraperitoneal solução salina 0,9%, Antibiótico (Ceftriaxona ou ertapenem) e β -lapachona 24 horas antes, momento da indução (Pré-tratamento) da CLP e 7 dias após CLP (Pós-tratamento). A taxa de sobrevivência foi analisada por um período de 16 dias. Após 12, 24 horas e 7 dias do procedimento cirúrgicos amostras dos animais de cada grupo foram coletadas e foi avaliado a migração leucocitária, carga bacteriana, parâmetros oxidativos (NO, MDA e TEAC) e fagocitose. Além disso, foi investigado *in vitro* a viabilidade celular do composto em diferentes concentrações. O grupo pré-tratado com β -lapachona mostrou aumento da taxa de sobrevivência de 100% em 16 dias. O pré- tratamento com β -lapachona causou um aumento na migração de células mononucleares e reduziu o número de neutrófilos para o peritônio. Apresentou também redução da carga bacteriana, níveis de NO e MDA reduzidos e aumentados níveis de antioxidante no soro. Por outro lado, houve aumento nas concentrações de MDA nas amostras de órgãos dos animais apesar do aumento de antioxidantes totais. Com relação ao pós-tratamento verificou-se aumento de sobrevivência em 60% e alguns parâmetros semelhantes ao grupo CLP tratado com salina. No ensaio de viabilidade celular verificou-se que a concentração de 1,00 μ M manteve 82% viáveis. Assim, os melhores resultados do potencial efeito farmacológico do composto no pré-tratamento, pode ter ocorrido porque a intervenção terapêutica ocorre mais cedo no processo da doença em comparação com a situação clínica.

Palavras-chaves: β -lapachona, Sepse, Imunomodulação.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. L. B. EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATOR EFFECT OF β -LAPACHONE IN SEPSIS MODEL AND *IN VITRO*. Masters Dissertation, Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2018.

Sepsis is a systemic inflammatory response resulting from an infection and failure of the host immune response. Despite the current treatments, sepsis remains one of the main causes of death in ICU. Thus, it is necessary to discover new therapies developed to control the infection. β -lapachone is an ortho-naphthoquinone obtained from the bark of *Tabebuia avellanedae* known for its antimicrobial and anti-inflammatory activity through immunomodulation. In this study, the effect of β -lapachone on polymicrobial infection induced by ligature and cecal perforation (CLP) was evaluated. Swiss mice were divided into 4 pre and post treated groups, and one of them only received the surgical procedure without induction of CLP (Sham). The others received intraperitoneal saline 0.9%, antibiotic (Ceftriaxone or ertapenem) and β -lapachone 24 hours before, induction time (Pretreatment) of CLP and 7 days after CLP (Post-treatment). The survival rate was analyzed for a period of 16 days. After 12, 24 hours and 7 days of the surgical procedure the samples of the animals of each group were collected and evaluated the leukocyte migration, bacterial load, oxidative parameters (NO, MDA and TEAC) and phagocytosis. In addition, the cell viability of the compound in different concentrations was investigated *in vitro*. The group pretreated with β -lapachone showed an increase in the survival rate of 100% in 16 days. Treatment with β -lapachone caused an increase in the migration of mononuclear cells and reduced the number of neutrophils to the peritoneum. It also showed reduced bacterial load, reduced NO and MDA levels and increased serum antioxidant levels. On the other hand, there was an increase in the concentrations of MDA in samples of animal organs despite the increase of total antioxidants. With regard to posttreatment, there was an increase in survival of 60% and some parameters similar to the CLP group treated with saline. In the cell viability assay it was found that the concentration of 1.00 μ M maintained 82% viable. Thus, the best results of the potential pharmacological effect of the compound on pretreatment may have occurred because the therapeutic intervention occurs earlier in the disease process compared to the clinical situation.

Keyword: β -lapachone, Sepsis, immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01:** Parede celular bacteriana
- Figura 02:** Reconhecimento de LPS por TLR4
- Figura 03:** A produção de espécies reativas por fagócitos.
- Figura 04:** Ativação do sistema complemento.
- Figura 05:** Cascata de coagulação na sepse.
- Figura 06:** A resposta do hospedeiro durante a sepse.
- Figura 07:** *Tabebuia avellanae*.
- Figura 08:** Estrutura química de β -lapachona.
- Figura 09:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD, a 350 nm, e espectro no UV da β -lapachona.
- Figura 10:** Delineamento experimental *in vivo*.
- Figura 11:** Procedimento da CLP.
- Figura 12:** Esquema dos procedimentos para avaliação da carga bacteriana.
- Figura 13:** Taxa de sobrevivência dos animais com sepse.
- Figura 14:** Peso corporal dos animais Sham e com sepse no decorrer do tempo.
- Figura 15:** Migração leucocitária nos animais com sepse.
- Figura 16:** Produção de óxido nítrico nos animais com sepse.
- Figura 17:** Produção de MDA no soro e peritônio de animais com sepse.
- Figura 18:** Produção de MDA nos órgãos dos animais com sepse.
- Figura 19:** Capacidade antioxidante total nos sangue e peritônio dos animais com sepse.
- Figura 20:** Capacidade antioxidante total nos órgãos dos animais com sepse.
- Figura 21:** Capacidade fagocítica dos animais com sepse.
- Figura 22:** Taxa de sobrevivência dos animais com sepse.
- Figura 23:** Migração leucocitária nos animais com sepse.
- Figura 24:** Produção de NO no soro e lavado peritoneal de animais com sepse
- Figura 25:** Produção de MDA no soro e lavado peritoneal de animais com sepse
- Figura 26:** Produção de TEAC no soro, lavado peritoneal e órgãos de animais com sepse.
- Figura 27:** Viabilidade celular em fibroblasto derivado de tecido pulmonar.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Abordagens de intervenções terapêuticas na sepse.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Escore do SOFA relacionado a Sepse.

Tabela 02. PRRs comumente estudados e seus PAMPs e DAMPs associados

Tabela 03. Composição da formulação, dose e via de administração utilizadas em estudos pré-clínicos de atividade de β -lapachona.

Tabela 04: Carga Bacteriana nos animais Sham e sépticos pré tratados com: solução salina 0,9%, Ceftriaxona (20 mg/kg) e β -lapachona (50 mg/Kg) após 24 horas da sepse induzida.

Tabela 05: Carga Bacteriana nos animais Sham e sépticos pré tratados com: solução salina 0,9%, Ceftriaxona (20 mg/kg) e β -lapachona (50 mg/Kg) após 24 horas da sepse induzida.

Tabela 06: Valor de IC50 em μ M/mL de β -Lapachona

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	Elemento de resposta antioxidante
CAT	Catalase
CD	Cluster of Differentiation
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CLP	<i>Cecal ligation puncture procedure</i> - Ligação e perfuração do ceco
CI50	Concentração Inibitória 50%
COX	Ciclooxigenase
CONA	Concavalina A
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERON	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
FT	Fator tecidual
GSH	Glutathiona reduzida
GPx	Glutathiona peroxidase
IC50	Concentração Inibitória 50%
IL	Interleucina
LBP	Proteína de Ligação
LPS	Lipopolissacarideo
LTA	Ácido Lipoteicóico
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IKK	I kappa B kinase
MAPK	Proteína ativada por mitogénio via cinase
MIF	Fator de Inibição da Migração
MyD88	Gene primário de diferenciação mielóide 88
Nrf2	Fator nuclear fator 2 relacionado ao E2
NF κ B	Fator nuclear κ B
NAD (P) H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NQO1	NAD (P) H: quinone oxidoreductase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a agentes patogénicos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
SOD	Superóxido dismutase

TLRs
TNF- α

Receptores tipo Toll
Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Sepses.....	17
2.2 Fisiopatologia da sepsis	19
2.2.1 ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS	22
2.2.2 ATIVAÇÃO SISTEMA COMPLEMENTO	25
2.2.3 ATIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO	27
2.2.4 MORTE CELULAR NECRÓTICA	29
2.2.5 IMUNOSSUPRESSÃO	29
2.3 Tratamento da sepsis	30
2.4 Imunomodulação na sepsis	31
2.5 Potencial terapêutico das plantas na sepsis	32
2.6 <i>Tabebuia avellanedae</i>	32
2.7 β -lapachona	34
3. OBJETIVO.....	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2. Específicos:.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Animais de experimentação	39
4.1.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	39
4.1.2 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E EUTANÁSIA	39
4.1.2 OBTENÇÃO DA β –LAPACHONA	39
4.2 Experimento in vivo.....	39
4.2.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
4.2.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA	43
4.2.4 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL, SANGUE E ÓRGÃOS.....	43

4.2.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	44
4.2.6 AVALIAÇÃO DA CARGA BACTERIANA	44
4.2.7 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	45
4.2.8 DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEIDO (MDA) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	45
4.2.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EQUIVALENTE AO TROLOX (TEAC) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	46
4.2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA	46
4.3 Testes <i>in vitro</i>	47
4.3.1 REAGENTES	47
4.3.2. CITOTOXIDADE PELO MÉTODO DIRETO 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2YL)-2,5-DIFENIL BROMETO DE TETRAZOLINA (MTT)	47
4.4 Análise estatística	48
5. RESULTADOS	49
5.1 Testes <i>in vivo</i> em animais pré-tratados.....	49
5.1.1 SOBREVIVÊNCIA	49
5.1.2 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	49
5.1.3 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	50
5.1.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA EM TECIDOS	52
5.1.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO	53
5.1.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO (MDA)	54
5.1.8 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE TEAC	57
5.1.9 CAPACIDADE FAGOCÍTICA DOS LEUCÓCITOS PERITONEAIS <i>ex vivo</i>	59
5.2 Testes <i>in vivo</i> em animais pós-tratados com as doses de β -lapachona (5 mg/kg e 1 mg/kg)	60
5.2.1 SOBREVIVÊNCIA	60
5.2.2 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	61

5.2.3	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO	62
5.2.4	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO (MDA)	63
5.2.5	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE TEAC	64
5.3	Teste <i>in vitro</i>	65
5.3.1	CITOTOXICIDADE CELULAR	65
6.	DISCUSSÃO	66
8.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	74

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma disfunção orgânica com potencial risco de morte, causada por a uma resposta imune desregulada no hospedeiro associada a um processo infeccioso, induzido principalmente por bactérias (SINGH; EVANS, 2012; SINGER et al., 2016). Durante a sepse, o organismo desencadeia uma resposta inapropriada, com produção excessiva de mediadores inflamatórios e desequilíbrio no sistema redox (STEARNNS-KUROSAWA et al., 2011). Desta forma, a regulação da resposta imune do hospedeiro é essencial para controlar os danos teciduais ocasionados pela inflamação e pelo próprio patógeno (MATSUKAWA et al., 2000).

Sepse é a principal causa de mortalidade de pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI), apesar de abordagens terapêuticas modernas, incluindo a intervenção cirúrgica, tratamento com antibióticos específicos, suporte nutricional ou terapias com anticorpos (CHUNG et al., 2003). Dessa forma, a procura por fármacos com alta eficiência anti-inflamatória e com menos efeitos colaterais possíveis são necessárias. Nesse sentido, β -lapachona é bastante estudada devido as suas atividades anti-inflamatória e imunomoduladora em vários processos patogênicos (SITÔNIO et al., 2012).

A β -lapachona é uma *orto*-naftoquinona isômera do lapachol, conhecida quimicamente por [3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol (1,2-b) pirano-5,6-diona]. Esta substância pode ser isolada do ipê roxo ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae*), da família Bignoniaceae (PLACHON et al., 1995; DOCAMPO et al., 1978). Este composto apresenta diversas atividades farmacológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, tripanossomicida, antirretroviral e anti-inflamatória (LI et al., 1993; GUIRAUD et al., 1994; PINK et. al., 2000; KRISHNAN et. al., 2001; CARVALHO et. al., 2002; PESSOA-ANTUNES et al., 2006; DONG-HO at. al., 2007; SALAS et al., 2008).

Estudos anteriores *in vitro* mostraram que β -lapachona reduz significativamente os níveis de óxido nítrico (NO) e a liberação de prostaglandina E2(PGE2). Além disso, a β -lapachona atenuou, de forma dose dependente, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas (IL) 1 β , 6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DONG-HO et. al., 2007). Em modelo *in vivo* de inflamação, este composto foi capaz de inibir o fator nuclear kappa B (NF- κ B) através da regulação proteína inibitória I κ B α , com redução de citocinas pró-inflamatórias e NO (SITÔNIO et al., 2012).

Em 2008, Byeon et. al. (2008) mostraram a ação anti-inflamatória de *Tabebuia avellanedae* em modelo de edema na orelha estimulada pelo ácido araquidônico, um ativador de ciclooxigenase (COX)-2 que catalisa a produção de PGE2, e pelo óleo de cróton, um ativador de leucotrienos B4 e lipoxigenase. Esses autores mostraram que o extrato aquoso de *Tabebuia avellanedae* diminuiu significativamente o edema nestes modelos, devido a inibição da expressão do RNAm das enzimas COX e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que levou a diminuição da produção de PGE2 e NO em macrófagos.

Outro estudos também relatam que a β -lapachona foi capaz de induzir a formação intracelular de espécies reativas do oxigênio (EROS) (SILVA et al., 2003; AIRES et al., 2014). O estresse gerado altera a divisão celular por interferir no “*checkpoint*” (ponto de checagem) levando a apoptose celular. Além disso, um estudo realizado por MACEDO et al. (2013) concluiu que a formação de EROS por β -lapachona produziu um efeito antimicrobiano sinérgico quando em combinação com antibióticos testados em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), resultados estes que podem ser aplicadas no futuro próximo em terapias alternativas para doenças infecciosas causadas por MRSA.

Mediante a alta taxa de mortalidade decorrente da sepse, é muito importante investigar a ação de compostos que possam inibir a resposta inflamatória sistêmica, desencadeada por células de defesa quando em contato com patógenos. Desta maneira, avaliar a ação de um potencial agente imunomodulador e anti-inflamatório, como a β -lapachona pode ser útil para atenuar doenças inflamatórias como a sepse.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sepses

A sepsis é definida pela *Society of Critical Care Medicine* e a *European Society of Intensive Care Medicine* como uma disfunção orgânica com potencial risco de morte devido a uma resposta imune desregulada do hospedeiro à uma infecção (SEYMOUR et al., 2016). Além da sepsis, o termo choque séptico foi definido como uma sepsis acompanhada por profundas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas capazes de aumentar a mortalidade substancialmente (SECKEL; AHRENS, 2016). O paciente pode ser clinicamente identificado com choque séptico quando estiver na presença da sepsis confirmada, mais hipotensão persistente. Nesse caso há a necessidade de vasopressor para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg e lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) após a reanimação volêmica adequada (SHANKAR-HARI et al. 2016).

O escore SOFA "*Sequential Organ Failure Assessment*" permite, em parte, avaliar a evolução da disfunção múltipla de órgãos, principal foco dos tratamentos intensivos (Tabela 01). A medida avalia o estado do paciente com base na função de seis sistemas de órgãos em uma pontuação que varia de 0 (Sem disfunção orgânica) à 4 (graves disfunções orgânicas) (DE GROOTH et al., 2017). A sepsis pode ser identificada através de Pontuação Total ≥ 2 pontos em SOFA, estando associado a uma mortalidade hospitalar superior a 10%. (SINGER et al., 2016). Porém, o escore SOFA não é de uso comum por necessitar de variáveis laboratoriais que podem não estar disponíveis rapidamente (SINGER et al., 2016).

Tabela 01. Escore do SOFA “*Sequential Organ Failure Assessment*”relacionado a Sepses. Adaptado de Singer et al. (2016).

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Respiratório PaO ₂ /FiO ₂ mmHg (kPa)	>400 (53,3)	<400 (53,3)	<300(40)	<200 (26,7) com suporte respiratório	<100 (13,3) com suporte respiratório
Coagulação Plaquetas, x10 ³ /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)	< 1.2 (110)	1,2 - 1,9 (110-170)	2 - 3,4 (171-299)	3,5 - 4,9 (300-440)	>5 (440)
Débito Urinário (mL/d)				<500	<200

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

Adicionalmente, foi sugerido uma nova medida denominada SOFA rápido (qSOFA) como forma de melhorar a triagem de pacientes sépticos sem usar qualquer variável laboratorial. Esta ferramenta permite avaliar de maneira mais simples e rápida a identificação de pacientes que correm risco de desenvolver sepse (DE GROOTH et al., 2017). 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).

Tem sido demonstrado que a mortalidade associada a sepse é crescente nos últimos anos(DELLINGER, 2007; MELAMED; SORVILLO, 2009; TANIGUCHI et al., 2014). Estudos relativos a epidemiologia da sepse em países com alta renda per

capita sugerem altas taxas de incidência. Na Austrália, em 2003, 194 por 100.000 habitantes, na Alemanha 335 casos por 100.000 habitantes em 2013, e nos Estados Unidos 580 por 100.000 habitantes em 2006 (HOTCHKISS et al., 2016). A mortalidade decorrente de sepse é cerca de 25-30%, e se eleva para 40-50% quando se trata de choque séptico (COHEN et al., 2015). Entretanto, espera-se um continuo aumento da mortalidade devido ao envelhecimento da população, aumento de doenças crônicas, uso de imunossupressores, quimioterapia, procedimentos invasivos e o desenvolvimento de agentes infecciosos mais virulentos e resistentes a antibióticos (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014; TURNIDGE, 2003). No Brasil, a sepse representa um significativo problema de saúde, a proporção de morte associada a sepse aumentou de 9,8% em 2002 para 16,5% em 2010 (TANIGUCHI et al., 2014).

2.2 Fisiopatologia da sepse

A resposta inflamatória na sepse é iniciada por micro-organismos em geral (vírus, bactéria, fungos e protozoários). Estudos recentes realizados pela “*European Prevalence of Infection in Intensive*” mostraram 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). Um estudo prospectivo realizado por TABAH et al. (2012) em 162 UTIs de 24 países, revelou que das infecções monomicrobianas, 58,3% eram causadas por gram-negativos, 32,8% por gram-positivos, 7,8% por fungos e 1,2% por anaeróbios estritos.

As bactérias são classificadas de acordo com a característica de sua estrutura da parede celular (gram-positivas e gram-negativas) e morfologia (Figura 01).

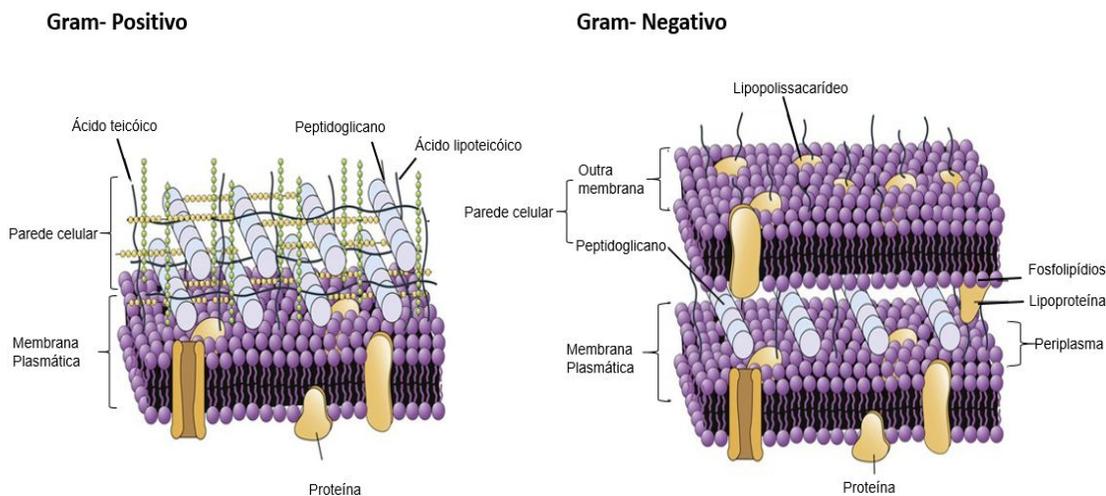


Figura 01: Parede celular bacteriana. Camada de peptidoglicano em paredes celulares gram-positivas e gram-negativas, juntamente com outras características únicas de sua estrutura. Fonte: adaptado de <https://clinicalgate.com/cell-structure-and-function/>

As bactérias 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-negativas, por sua vez possuem uma fina camada de peptideoglicano 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 lípido A e cadeia O, que é única para cada sorotipo bacteriano, e importante fator de virulência (KABANOV et al. 2010)

A infecção microbiana é detectada através de estruturas comuns compartilhadas por uma grande maioria de patógenos, os chamados padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs). (MOSSIE, 2013; BOYD; RUSSELL; FJELL, 2014; CAWCUTT; PETERS, 2014). Os PAMPs são reconhecidos por receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) que estão localizados em membranas celulares e compartimentos citosólicos de células imunes especializadas como macrófagos, células dendríticas (CD) e polimorfonucleares (PMN) (RAYMOND et al., 2017a)

Os mamíferos possuem várias classes distintas de PRRs, incluindo os receptores tipo Toll (TLRs), uma família de pelo menos 12 proteínas de membrana que desencadeiam respostas imunes inata (Tabela 02).

Tabela 02. PRRs comumente estudados e seus PAMPs e DAMPs associados. Adaptado de Raymond et al. (2017).

PRRs	Localização	PAMPs	DAMPs
TRL1	Membrana Plasmática	Lipoproteína	
TRL2	Membrana Plasmática	Lipoproteína Peptidoglicano Ácido lipotóicoico	HMGB1 Hsp70 S100
TRL3	Endossoma	RNA Viral	
TRL4	Membrana Plasmática	Lipopolissacarídeo	HMGB1 Hsp70 S100 Ácido hialurônico
TRL5	Membrana Plasmática	Flagelina	
TRL6	Membrana Plasmática	Lipoproteína	
TRL7	Endossoma	RNA Viral	
TRL8	Endossoma	RNA Viral	
TRL9	Endossoma	DNA de patógeno	mtDNA nDNA
Dectina	Membrana Plasmática	Beta-glucanos	
Mincle	Membrana Plasmática		SAP130
NOD1	Citoplasma	Peptidoglicano	
NOD2	Citoplasma	Peptidoglicano	
NALP3	Citoplasma	RNA Viral RNA Viral	nDNA ATP ÁcidoÚrico
RIG-1	Citoplasma	RNA Viral	
MDA5	Citoplasma	RNA Viral	
RAGE	Membrana Plasmática		AGEs HMGB1 S100

Legenda: TRL:Receptores do tipo Toll; NOD: Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos; RIG-1:Gene induzido por ácido retinoico I; MDA: Gene associado à diferenciação do melanoma 5; RAGE: receptor para produtos finais de glicação avançada.

Os TLR-2 irão reconhecer os PAMPs de bactérias gram-positivas, incluindo lipoproteínas, lipopeptídeos, peptideoglicanos e LTA, enquanto o TLR4 é responsável pelo reconhecimento de LPS e se destaca por ser um dos principais mediadores da sepse (NEILL; GOLENBOCK BOWIE, 2013; KAWASAKI; KAWAI, 2014;). A ativação

desses receptores resulta na expressão de genes associados à inflamação, estimulando o sistema imune inato do hospedeiro, e imunidade adaptativa com ativação de linfócitos B e T que são específicos para antígenos particulares (PRUCHA; ZAZULA; RUSSWURM, 2017)

Durante o início da infecção, uma complexa cascata de eventos é iniciada após a invasão do hospedeiro por microorganismos patogênicos. Na sepse ocorre então, um processo dinâmico que abrange uma resposta hiperinflamatória seguido de uma resposta anti-inflamatória compensatória (RAYMOND et al., 2017b; YUKI; MURAKAMI, 2015). Como mostrado na figura 02, o estado pró-inflamatório é caracterizado pela ativação de Leucócitos, do sistema complemento, da cascata de coagulação e morte celular necrótica resulta em danos ao próprio organismo (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

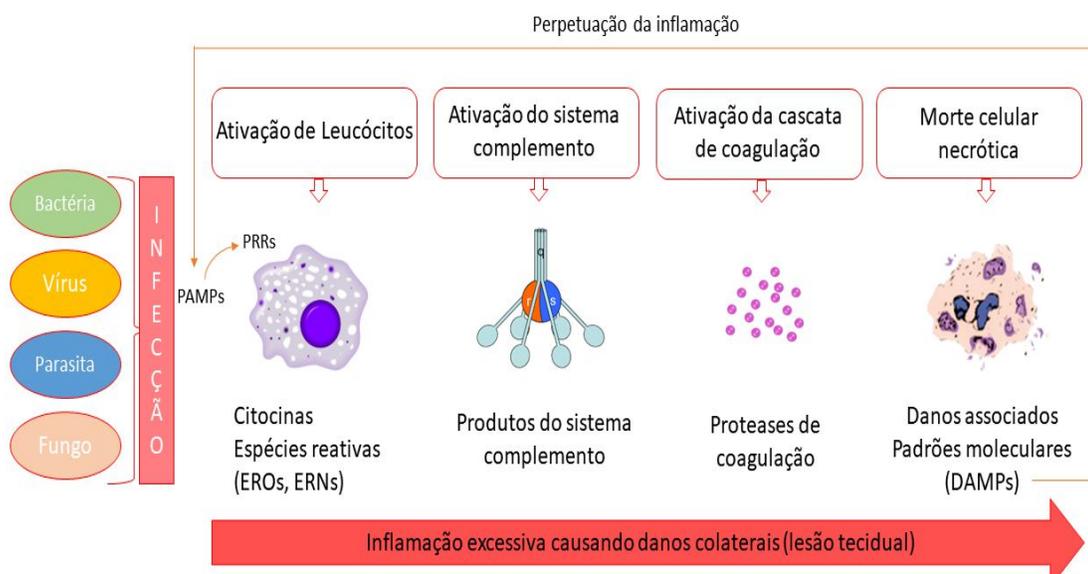


Figura 02: A resposta do hospedeiro durante a sepse. Após infecção causada por bactérias, vírus, parasitas ou fungos e reconhecimento de PAMPs por PRRs ocorre ativação de leucócitos, sistema complemento, cascata de coagulação e por consequência da inflamação exagerada a lesão colateral do tecido com morte celular necrótica, que resulta em liberação de padrões moleculares associados a dano DAMPs que perpetuam a inflamação. Fonte: Adaptado de Angus; Van der poll, (2013).

2.2.1 ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS

A resposta do hospedeiro à sepse é acionada pela ativação TLRs em células imunes tais como macrófagos, PMN e células dendríticas. O reconhecimento de PAMPs por estes receptores sinalizam uma resposta direcionada na eliminação do patógeno. Os TLRs interagem com a molécula adaptadora, gene primário de

diferenciação mielóide 88 (MyD88), resultando em ativação de fatores de transcrição, como o Fator Nuclear κ B (NF κ B). O NF κ B é o principal fator de transcrição durante a inflamação, que regula a transcrição de genes para mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 entre outras, conforme mostrado na Figura 03 (KENDRICK; JONES, 2008; YUKI; MURAKAMI, 2015).

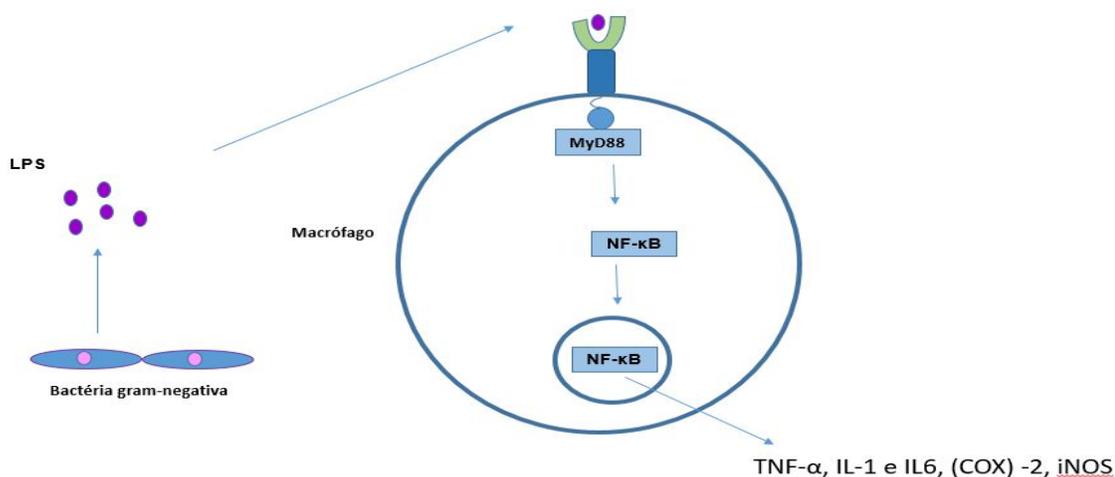


Figura 03: Reconhecimento de LPS por TLR4 expressos pelas células de resposta imune do hospedeiro como os macrófagos. O domínio intracelular de TLR4 interage com MyD88 com posterior ativação de NF- κ B e transcrição de mediadores pró-inflamatórios. Fonte: Adaptado de SHUKLA et al., (2014)

A proteína MyD88 recruta cinases associadas ao receptor da IL-1 para ativar o fator 6 associado ao receptor de TNF- α , que ativa o fator de crescimento beta associado a cinase 1, que em seguida ativa o complexo IKK. Este complexo promove a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta na ativação do NF- κ B, que será translocado para o núcleo para induzir a expressão de mediadores pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 e IL6, COX-2, e das moléculas de adesão (KENDRICK; JONES, 2008; RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). Além disso, são produzidos EROs por células fagocíticas que atuam na eliminação da infecção pela capacidade microbicida resultante da explosão oxidativa (KAYMAK; BASAR; SARDAS, 2012).

As principais células responsáveis pela fagocitose e destruição de agentes patogênicos durante a infecção do hospedeiro são os neutrófilos e os monócitos/macrófagos. 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 radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), que é altamente reativo, ou será metabolizado pela enzima mieloperoxidase (MPO) resultando na formação de ácidos (Figura 04) (REPETTO et al. 2012; KEHRER e KLOTZ, 2015).

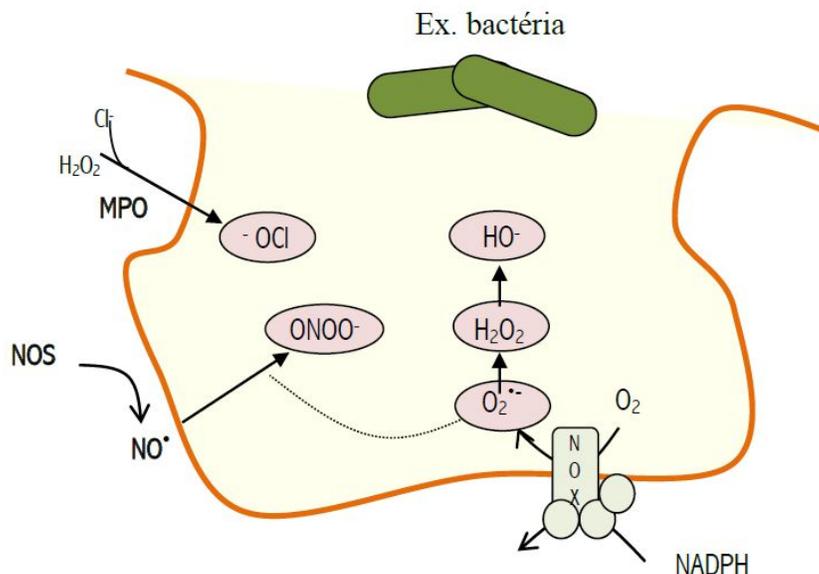


Figura 04: A produção de espécies reativas por fagócitos. Os fagócitos são capazes de gerar espécies reativas por meio do “oxidative burst”, mediado por NADPH oxidase (NOX). Peróxido de hidrogênio produzido durante a reação, pode sofrer redução para a forma do radical hidroxil, ou ser metabolizado pelo mieloperoxidase (MPO) com formação de ácidos. A óxido nítrico sintase (NOS) irá produzir $\text{NO}\cdot$, outro radical que pode originar outras espécies reativas, como o peróxinitrito. Fonte: Adaptado de Kehrer e Klotz (2015).

Além das EROs, durante a fagocitose ocorre a produção de ERN, cujo principais representantes são o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e peróxido nítrico ($\text{ONOO}\cdot$). A ação sobre células endoteliais, mediada por NO , leva a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos para o tecido infectado. No entanto, estímulos que induzem a inflamação levam a ativação da iNOS que produz quantidades muito maiores de NO , sendo a ativação sustentada por vários dias. O NO pode então reagir com $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar $\text{ONOO}\cdot$, responsável por danos celulares irreversíveis (SNOWDEN; KIRKMAN, 2002).

Nos pacientes com sepse, os níveis de espécies reativas estão elevados e os sistemas antioxidantes apresentam-se reduzidos, com a diminuição da superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase e depleção da glutatona (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 aos danos em células próprias, inclusive no endotélio (CIMOLAI et al. 2015; YU et al. 2015). O excesso de produção de EROS e ERNS durante a sepse, pode resultar em prejuízos, incluindo significativa citotoxicidade para os órgãos (KENDRICK; JONES, 2008; GALLEY, 2011; BOSMANN; KAYMAK; BASAR; SARDAS, 2012; WARD, 2014).

2.2.2 ATIVAÇÃO SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é ativado como forma de reação a uma infecção. Apesar do seu papel em proteção, o sistema também pode contribuir para o desenvolvimento de complicações graves que pioram significativamente o prognóstico de pacientes sépticos. Esse sistema possui três vias de ativação, a clássica, a via lectina e a via alternativa. A ativação é iniciada por imunoglobulina, manose, ou ligação à superfície de um patógeno respectivamente. Todas as vias de ativação de complemento seguem uma sequência de reações para a gerar a chamada protease C3 convertase (JANEWAY et al., 2001; DEJAGER et al., 2011).

A protease formada cliva C3 em C3a, uma anafilotoxina e C3b uma opsonina. O C3b liga-se ao complexo C4b2a para formar C5 (C4b2a3b), uma protease que cliva C5 em C5a, uma potente anafilotoxina e em C5b (MARKIEWSKI; DEANGELIS; LAMBRIS, 2008). 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), 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 (Figura 05) (VOGOT et al. 1992).

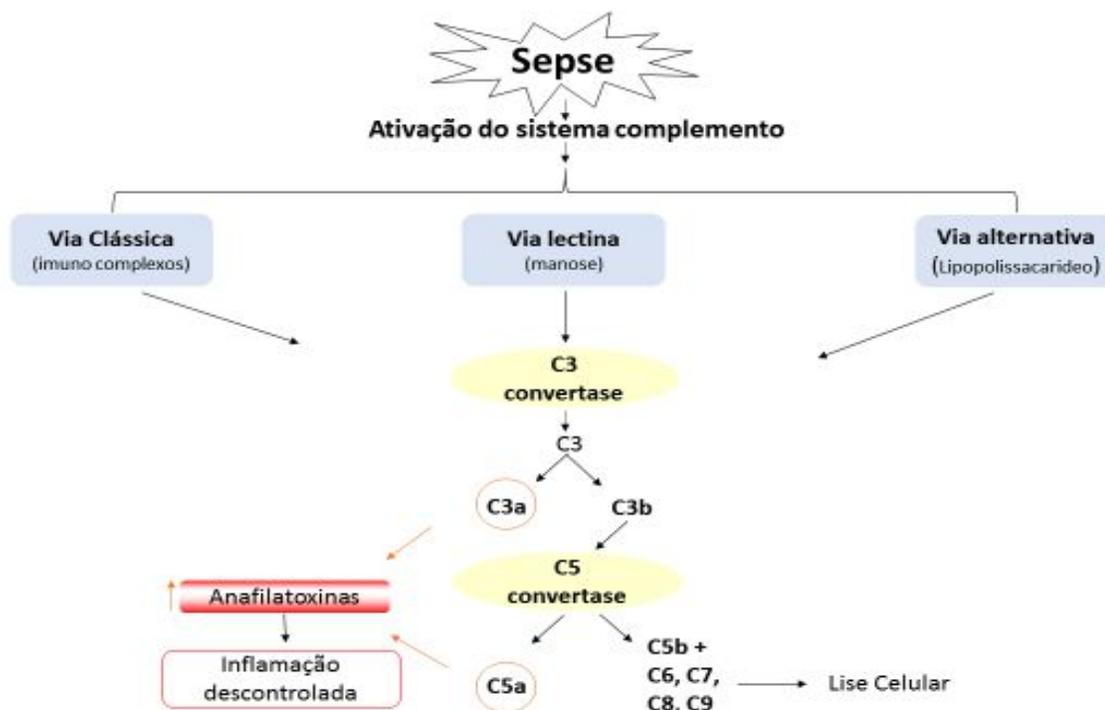


Figura 05: Ativação do sistema complemento. A ativação induzida por sepse das três vias do complemento resulta, coletivamente, na geração das anafilatoxinas pró-inflamatórias C3a e C5a. O sistema de complemento pode ser ativado por pelo menos três caminhos diferentes, cada um dos quais leva à clivagem de C3 e C5 pelas converstases C3 e C5. Durante a sepse, no entanto, a ativação excessiva do sistema do complemento leva a inflamação descontrolada. Fonte: Adaptado de DeJager, et al. (2011).

Em modelos experimentais de sepse e na clínica, são detectados altos níveis plasmáticos de anafilatoxinas C5a e C3a, indicando ativação do sistema complemento. Nos estágios iniciais da sepse tal ativação é benéfica para a defesa do hospedeiro. Os fragmentos C3a e C5a estão envolvidos em eventos inflamatórios tais como aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, e extravasamento de leucócitos. A deficiência de C3 em camundongos e em indivíduos os torna mais vulneráveis a infecções, pela não formação de MAC. No entanto, a ativação do sistema complemento pode se tornar excessiva levando a uma inflamação descontrolada (MARKIEWSKI; DEANGELIS; LAMBRIS, 2008).

A grande quantidade de anafilatoxina gerada interage com receptores C5ar, C3ar e C5I2, presentes não só em fagócito, mas também em células não mieloides, como as células endoteliais. Ensaios pré-clínicos verificaram a o papel de tais receptores na progressão da sepse polimicrobiana induzida por ligadura e punção cecal (CLP). A ativação desses receptores sinaliza, em resposta a um segundo

estímulo, por exemplo produzido por um PAMP, a liberação de grânulos citoplasmáticos, produção de EROS e quimiotaxia (CHEN et al., 2007; RITTIRSCH et al., 2008; WIERSINGA et al., 2014). Além disso, a ação de C5a pode induzir a cascata de coagulação e liberação de citocinas, tais como Fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) e proteína de alta mobilidade Box-1 (HMGB1) (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). A ativação exagerada do sistema complemento contribui ainda para efeitos nocivos como alteração das funções imunológicas, apoptose de timócitos e células medulares supra-renais e cardiomiopatia (DEJAGER et al., 2011).

2.2.3 ATIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO

A regulação positiva do fator tecidual (FT) é o ponto iniciador mais importante da cascata de coagulação e formação de trombina na sepse. O ambiente pró-inflamatório, por ação de LPS, citocinas inflamatórias ou endotoxinas, provocam na sepse o aumento da expressão de FT em monócitos e endotélio danificado (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; MOSSIE, 2013; LEVI; VAN DER POLL, 2017). 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, com o objetivo de bloquear a propagação da infecção (HENKIN et al., 2009; MOSSIE, 2013) como mostrado na figura 06.

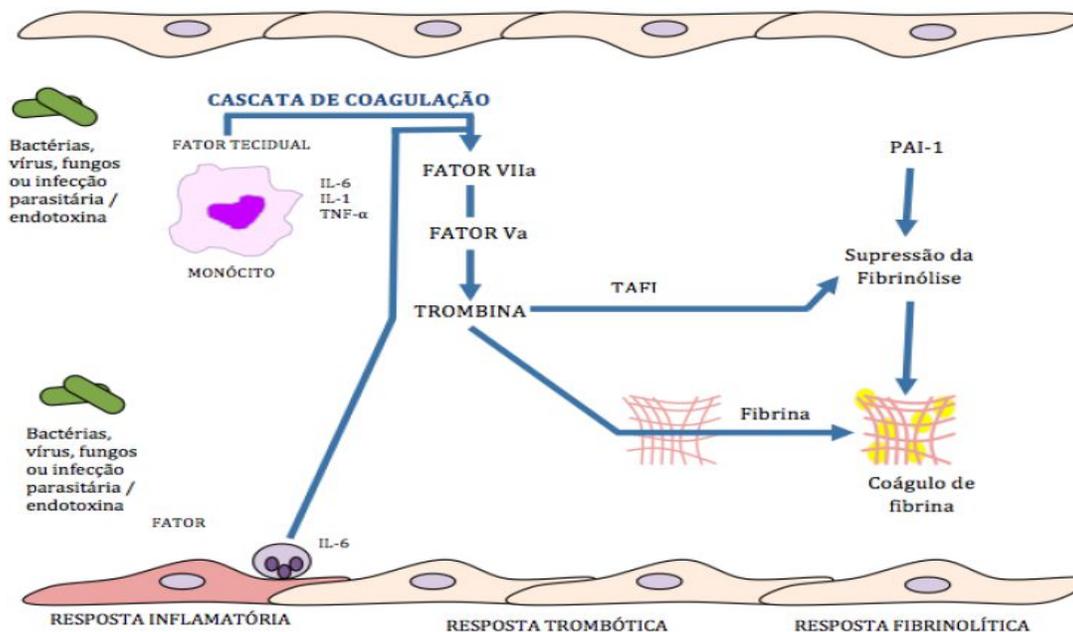


Figura 06: Cascata de coagulação na sepse. O fator tecidual é exposto, após indução, por padrões moleculares associados a agentes patogênicos, tais como LPS, citocinas inflamatórias ou endotoxinas. O FT se liga ao fator VIIa, ativando-o e o complexo fator VIIa/tromboplastina ativa o Fator X em Xa. O 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)

A disfunção dos mecanismos anticoagulantes fisiológicos com baixa de antitrombina, proteína C e inibidor da via do fator tecidual (TFPI) foram observados em pacientes sépticos. A redução de anticoagulantes na sepse pode ser causada por aumento do consumo, diminuição da síntese e degradação por proteases, tais como plasmina (DANIEL G. REMICK, 2002; SNOWDEN; KIRKMAN, 2002; WIERSINGA et al., 2014). Ocorre também, o aumentando da síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), interrompendo a fibrinólise (RUSSEL, 2006). Tais eventos culminam no desenvolvimento de trombos, que é ainda mais facilitado pela formação de “*neutrophil extracellular traps*” na tentativa dos neutrófilos em capturar e matar micro-organismos, assim como ativar outras células imunes (ANGUS; VAN DER POLL, 2013; WIERSINGA et al., 2014).

A ativação da cascata de coagulação e sistema complemento podem ainda atuar em conjunto para amplificar as condições inflamatórias e trombóticas na sepse. Componentes de cada cascata interagem com receptores de superfície celular para mediar tais efeitos biológicos (FLOREA LUPU, RAVI S. KESHARI, JOHN D.

LAMBRIS, 2014; OIKONOMOPOULOU et al., 2012). A extensão da ativação da cascata de coagulação durante a sepse pode variar de proporções menores até a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CIVD) (RITTIRSCH, FLIERL e WARD, 2008).

2.2.4 MORTE CELULAR NECRÓTICA

O resultado da inflamação exagerada na sepse é a lesão tecidual e morte celular necrótica com liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), também chamados de sinais de perigo endógenos (SHUKLA et al., 2014; RAYMOND et al., 2017b). Os DAMPs são moléculas que possuem proteínas similares aos das bactérias, podendo assim ser reconhecida por PRRs. O reconhecimento dessas moléculas por células imunes sustenta a resposta inflamatória em curso através da estimulação constante de PRRs (LÁSZLÓ et al., 2015).

A proteína de alta mobilidade Box-1 (HMGB1), liberada por células necróticas, atua como um dos principais mediadores da inflamação sistêmica (SHUKLA et al., 2014). O HMGB1 facilita a expressão e/ou replicação do DNA, que também possui propriedades semelhantes às citocinas. Pode ser liberada por apoptose numa forma oxidada que não induz resposta imune. Entretanto, quando secretada ativamente durante a necrose, em sua forma reduzida pode induzir o NF-KB, com indução da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; DIENER et al., 2013; MOSSIE, 2013;). O ciclo que gira em torno da inflamação e do sistema hemostático pode em casos mais extremos, resultar em maiores complicações como trombose microvascular, hipoperfusão, e por fim em disfunção orgânica múltipla e morte em poucas horas (HARDAWAY; WILLIAMS; VASQUEZ, 2001). O organismo na tentativa de reestabelecer a homeostase gera então uma mudança de resposta do hospedeiro, levando o indivíduo a um estado de imunossupressão (CHUN et al., 2015)..

2.2.5 IMUNOSSUPRESSÃO

Os efeitos cumulativos da resposta imune desregulada durante a sepse ameaçam à função orgânica e leva a um aumento da mortalidade. A resposta anti-inflamatória sistêmica compensatória é então estimulada por mecanismos neurais

com finalidade de atenuar a inflamação sistêmica. Há um aumento de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10, e produção reduzida de citocinas como IL-1 β , TNFa, IL-6) (CHUN et al., 2015).

Além disso, ocorre depleção de células T e B por apoptose no baço, pulmão, intestino, nódulos linfáticos e outros órgãos. As células circulantes se tornam então anérgicas resultando em apresentação ineficaz de antígenos (PINHEIRO DA SILVA; NIZET, 2009; BOSMANN; WARD, 2014). A progressão do estado imunossuprimido aumenta a susceptibilidade a infecções secundárias. A resposta anti-inflamatória sistêmica compensatória também está diretamente relacionada com o aumento da mortalidade destes pacientes sépticos (BOYD; RUSSELL; FJELL, 2014).

2.3 Tratamento da sepse

Em pacientes com sepse, as primeiras horas são de valiosa importância para a evolução da sepse. Terapias de suporte como corticosteróides, 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 tratamento 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 3^o 4^o 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, se mesmo com tais medidas 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).

2.4 Imunomodulação na sepse

Apesar dos tratamentos atuais, a sepse ainda é responsável por uma alta taxa de mortalidade. A resistência bacteriana, assim como os danos gerados pela inflamação aguda na sepse, tem um papel crítico para o aumento da mortalidade. O interesse pela utilização de terapias imunomoduladoras destinadas a melhorar este quadro tem sido crescente (MAZZIO et al., 2016; YADAV; CARTIN-CEBA, 2016). Os imunomoduladores são agentes que possuem a capacidade de normalizar ou modular processos fisiopatológicos (SHUKLA; BAJPAI; KIM, 2014). As estratégias imunomoduladoras como supressão da resposta imune aplicadas precocemente em pacientes durante o estado inflamatório podem ser benéficas (AZIZ et al., 2013). Dentre as pesquisas atuais experimentais e clínicas, a imunomodulação está entre as abordagens para a intervenção da sepse como mostrados no quadro 01.

AGENTE	MECANISMO DE AÇÃO
Sequestrantes de LPS	Neutraliza a atividade do LPS
Inibidores do HMGB-1	Bloqueia a atividade do HMGB-1
Inibidores de MIF	Atua frente ao MIF
Peptídeos antimicrobianos	Antibacteriano e neutraliza a atividade o LPS
Curcumina	Inibe a atividade transcritora de NF-kB
Diaceréina	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-kB e tem ação antioxidante

Quadro 01. Abordagens de intervenções terapêuticas na sepse. Fonte: Adaptado de Shukla et al. (2014).

2.5 Potencial terapêutico das plantas na sepse

As plantas são fontes importantes de pesquisas que visam a descoberta de novas substâncias com atividades farmacológicas (LUSTOSA et al., 2016). São utilizadas desde a antiguidade como abordagem terapêutica de muitas doenças (ARCHANA , SURESH JATAWA, 2011). Os extratos e porções ativas das plantas também são recursos valiosos no desenvolvimento de novos agentes para complementar os tratamentos atuais (JANTAN; AHMAD; BUKHARI, 2015).

O estudo de substâncias provenientes de plantas medicinais com potencial imunomodulador que possam promover a resolução da inflamação de uma maneira homeostática é de fundamental importância (RECIO; ANDÚJAR; RÍOS, 2012). Nesse sentido, um estudo referente a suplementação de *Momordica charantia* na dieta alimentar de camundongos com sepse induzida por LPS revelou que o vegetal reduziu níveis de mediadores e fatores de transcrição pro-inflamatórios, tais como NF- κ B, iNOS e COX-2 nesses animais (CHAO et al., 2014). Além disso, Popov et al. (2011), mostraram que o extrato de *Capsicum* spp. no modelo de sepse foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a sobrevivência dos animais.

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 esteroide. Estes autores observaram a redução na migração de neutrófilos, e a inibição também das enzimas pró-inflamatórias, tais como a iNOS e (COX)-2. Dessa forma, as plantas e seus compostos ativos podem ser uma fonte de novas opções terapêuticas em casos de inflamação descontrolada como na sepse.

2.6 *Tabebuia avellanedae*

Tabebuia avellanedae, pertencente à família Bignoniaceae, é uma árvore nativa da América do Sul (Figura 07). No Brasil é particularmente encontrada no nordeste brasileiro, sendo comumente conhecida como " pau-d'arco " ou " ipê-roxo" (FREITAS et al., 2013). A altura alcançada pela espécie varia de 20 a 35 m e largura do troco entre 30 a 60 cm de diâmetro. Suas folhas são compostas por 5 folíolos quase glabros, medindo 5 a 15cm de comprimento. Durante a floração as flores vermelho-arroxeadas cobrem quase que completamente a planta (LORENZI,2002).



Figura 07: *Tabebuia avellanedae*. Fonte: <http://www.freewords.com.br/ipe-roxo/>

Esta planta é utilizada na medicina popular desde a era Inca (YAMASHITA et al., 2009; KIM; JEON; LEE, 2013). A espécie era chamada de "árvore divina" pelos povos indígenas da América do Sul, pela versatilidade no tratamento de várias doenças crônicas. O produto obtido a partir da casca, denominado Taheebo, tem sido utilizado há mais de 1.500 anos em diversas aplicações etno farmacológicas (SUO et al., 2013; SUO; YAN, 2016;). A infusão da casca é utilizada por colombianos como estimulante do sistema nervoso central. O uso da infusão por brasileiros tem por finalidade tratar malária, câncer, distúrbios estomacais, febre, infecções bacterianas e fúngicas e para alívio de distúrbios do estado mental (BYEON et al., 2008; FREITAS et al., 2013).

Vários estudos têm demonstrado que as frações da planta possuem ações como antibacteriana, antifúngica, diurética, anticoagulante, laxantes, anticâncer e anti-inflamatória (YAMASHITA et al., 2009; LEE et al., 2012). Byeon et al.(2008) relataram níveis reduzidos de PGE2 e NO em macrófagos tratados com o extrato aquoso da planta. Suo et al. (2012) também mostraram um efeito anti-inflamatório de cinco compostos presentes em *Tabebuia avellanedae*, com inibição de citocinas como TNF- α e IL-1 β em células de mieloma co-estimuladas por LPS.

As frações isoladas de *Tabebuia avellanedae* obtidas a partir da casca são produtos bioativos como antraquinonas, flavonoides, derivados de benzaldeído, derivados do ácido benzoico, cumarinas, iridoides e naftoquinonas (KIM; JEON; LEE, 2013). As naftoquinonas são metabolitos secundários que possuem em sua estrutura molecular o anel quinonoídica sustentado por anel naftalênico. Estas moléculas tem

despertado o interesse cada vez maior para pesquisadores de todo o mundo, devido à sua grande diversidade estrutural e atividades biológicas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Dentre as naftoquinonas que ocorrem naturalmente na planta em maior abundância estão o lapachol, α -lapachona e β -lapachona (CAVALCANTE et al., 2008). Dentre estes, a β -lapachona vem sendo bastante estudada devido a sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (CRUZ; DOCAMPO; BOVERIS, 1978; ABREU; GOULART; BRETT, 2002; SITÔNIO et al., 2012).

2.7 β -lapachona

A β -lapachona (Figura 08), conhecida quimicamente por 3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]pirano-5,6-diona, é uma orto-naftoquinona lipofílica obtida a partir da Figura 08 (PINTO et al., 1977; CAVALCANTE et al., 2008; DU et al., 2015). A molécula de cor vermelho alaranjada é sintetizada a partir da ciclização do lapachol catalisada por ácido sulfúrico (HOOKER, 1936). O composto possui uma forma bem definida de cristais aciculares, visíveis a olho nu, possuem um tamanho praticamente uniforme, em cerca de 233,1 μm , e instabilidade quando expostos à luz fluorescente com mudança da cor de laranja para vinho. Apesar da forma cristalina, a β -lapachona apresenta propriedades de fluxo e compactação adequadas para desenvolvimento farmacotécnico (ALVES et al., 2008).

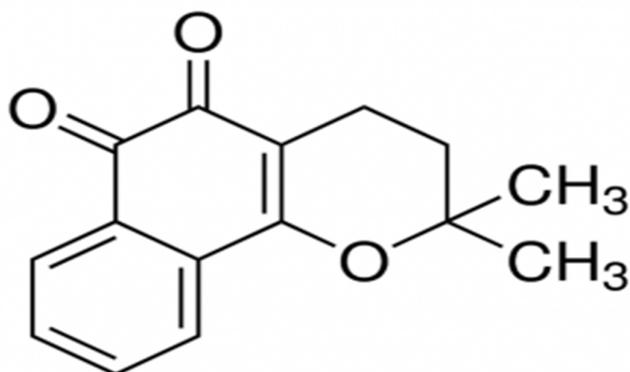


Figura 08: Estrutura química de β -lapachona Fonte: <http://www.beta-lapachone.com/>

A β -lapachona apresenta fraca solubilidade em água (0,16 mM) (CAVALCANTI et al., 2011), sendo tal característica, bem como a biodegradação no fígado e intestino

delgado, relacionadas com a baixa biodisponibilidade após administração oral. Estudo referente a farmacocinética do composto através do método de HPLC mostrou uma biodisponibilidade baixa após administração oral, de cerca de 15%. Este mesmo estudo verificou uma concentração plasmática máxima de 0.218 ($\mu\text{g/ml}$) quando administrada uma dose de 40mg/kg em ratos (KIM et al., 2015). Apesar de novas pesquisas quanto ao uso de polímeros como estratégias que possibilitem aumentar a solubilidade e a dissolução de β -lapachona após administração oral, as administrações intraperitoneal ou intravenosa demonstraram ter maior bioacessibilidade para os locais de ação (BERMEJO; ISABEL, 2016)

O composto utilizado neste estudo apresenta um bom grau de pureza demonstrado a partir da avaliação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). Não se observa indício de lapachol ou α -lapachona (isômero de β -lapachona). No cromatograma da Figura 09 observa-se apenas o pico relativo característico da β -lapachona, com área de 100% e tempo de retenção de 27,4 minutos. No espectro no UV obtido online (Figura 1) observaram-se as bandas de absorção com máximos de absorção (I_{max}) de 212,0, 256,8 e 290,0 nm, características da β -lapachona, conforme literatura (Cunha-Filho et al, 2007)

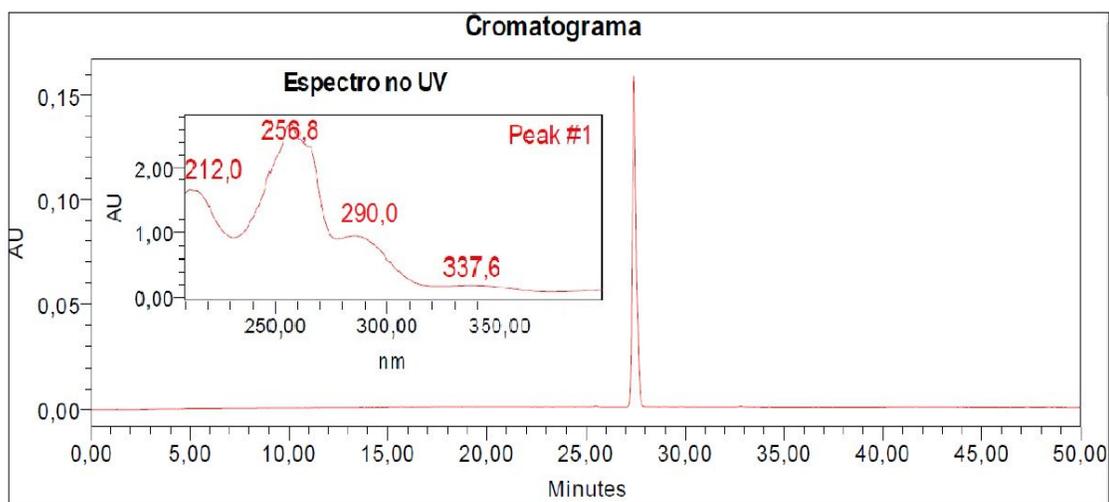


Figura 09: Cromatograma obtido por CLAE-DAD, a 350 nm, e espectro no UV da β -lapachona. Fonte: Pontes (2016)

A β -lapachona tem sido relatado por apresentar uma variedade de ações farmacológicas como antibacteriana, antifúngica, antiplaquetária, antiviral, antiparasitária e mais notadamente como anticancerígena e anti-inflamatória (TZENG et al., 2003; LEE et al., 2015). As atividades biológicas de β -lapachona estão

atribuídas à sua capacidade redutora das ortoquinonas. A molécula pode ser bioativada pela enzima NQO1 (NADPH- quinina oxidase) gerando EROS. A tabela 03 mostra as pesquisas quanto as atividades da β -lapachona em estudos pré-clínicos bem, como o uso de diferentes formulações para a dissolução total de β -lapachona.

Tabela 03. Composição da formulação, dose e via de administração utilizadas em estudos pré-clínicos de atividade de β -lapachona. Adaptado de Bermejo et al. (2016)

Modelo animal	Via	Dose (mg/kg)	Formulação	Atividade	Referência
Ratos Sprague-Dawley machos (260-300 g)	IV	1,5	Solução em DMSO a 50%	Anticancerígena	OUGH et al., 2005
Camundongos albino swiss (30 g)	IP	50	10% (DMSO), Tween 80 a 1%	Antiparasitária	AIRES et al., 2014
Ratos fêmeas com tumor e sem timo (25 g)	IV	30-50	Micelas poliméricas PEG-PLA 5% p / p	Anticancerígena	BLANCO et al., 2011
Camundongos aMHC-ACS-transgênico	Oral	50	SDS	Cardioprotetor	JEONG et al., 2014
Camundongos C57BL/6 (20-25g)	IP	5	DMSO	Anti-inflamatória	XU et al., 2014
Camundongos fêmea SCID (20 g)	IT	14,17	Mistura HPb-CD/ Poloxamer 407	Anticancerígena	SEOANE et al., 2013

Legenda: DMSO dimetilsulfóxido, PEG-PLA poli(etilenoglicol) -co-poli (ácido D, L-láctico), SDS Dodecil sulfato de sódio, HPb-CD hidroxipropilo beta-ciclodextrina, IP intraperitoneal, IV intravenosa, IT intratumoral

Estudos *in vitro* realizados por Cruzet al. (1978) verificaram a inibição do crescimento de cepas *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* tratadas com β -Lapachona. Além disso, este composto apresentou ação efetiva contra as cepas de MRSA quando em combinação com beta-lactâmicos, carbapenêmicos, e fluoroquinolonas (MACEDO et al., 2013).

Em relação a atividade anti-inflamatória, foi demonstrado por Lee et al. (2015) que houve a inibição da expressão de iNOS e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , e IL-6, assim como elevou a expressão de moléculas anti-inflamatórias

como IL-10, heme oxigenase-1 (HO-1) pela β -lapachona em modelo de neuroinflamação. Estudos *in vitro* realizados por XU et al. (2014) em células da micróglia e CDs induzidas por LPS demonstraram que a β -lapachona inibiu a expressão de IL-12 e IL-23, citocinas estas que tem um papel chave no desenvolvimento de doenças inflamatórias do sistema nervoso central.

Tendo em vista a resposta sistêmica hiperinflamatória da sepse desencadeada após o reconhecimento de micro-organismos patogênicos ou a sinais de perigo endógeno, e as atividades farmacológicas apresentadas por β -lapachona como anti-inflamatória e antimicrobiana é de grande relevância o estudo do composto em modelo de sepse.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito imunomodulador β -lapachona em modelo animal de sepse

3.2. Específicos:

- Avaliar a sobrevivência dos animais pré-tratados com β -lapachona (50 mg/kg) e pós-tratados (5 mg/kg e 1 mg/kg) após sepse induzida;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento e pós-tratamento com β -lapachona no sangue e no exsudato peritoneal de animais com sepse (modelo CLP) sobre os seguintes parâmetros: migração leucocitária; carga bacteriana, concentração de óxido nítrico e capacidade fagocítica
- Avaliar o efeito do pré-tratamento e pós-tratamento com β -lapachona no sangue, exsudato peritoneal e tecidos (baço, coração, pulmão e fígado) de animais com sepse (modelo CLP) sobre os parâmetros oxidativos: peroxidação lipídica, e a capacidade antioxidante total (TEAC)
- Avaliar citotoxicidade das diferentes concentrações de β -lapachona em fibroblasto pulmonar pelo método direto MTT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

4.1.1 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPa e obteve aprovação sob o parecer de número 1912080716 (ANEXO 1).

4.1.2 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E EUTANÁSIA

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss machos e fêmeas de 8 a 12 semanas de idade (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 estudo aproximadamente 60 animais distribuídos em 4 grupos, cada grupo foi dividido em animais pré e pós tratados.

4.1.2 OBTENÇÃO DA β -LAPACHONA

As amostras de β -lapachona utilizadas neste estudo foram fornecidas gentilmente pela professora Dra. Alaíde Braga De Oliveira da Universidade Federal do Pará.

4.2 Experimento *in vivo*

Para a realização da avaliação imunomoduladora de β -lapachona *in vivo*, os animais foram divididos em grupos pré-tratados 24 horas antes da indução da sepse e pós-tratados por 7 dias e 3 dias de 12 em 12 horas após a indução de sepse. O pré-

tratamento foi realizado em busca de uma possível profilaxia em cirurgia, como um instrumento importante na prevenção da infecção e inflamação. No pós tratamento avaliamos a resposta desencadeada pela intervenção do tratamento após sepse já instalada.

Para a indução da sepse foi usado o método da ligadura e punção do ceco (Cecal ligation and puncture - CLP), neste modelo o ceco é desvascularizado por ligadura como forma de preservar a continuidade intestinal e perfurado de forma padronizada (FINK, 2001; RITTIRSCH et al., 2009). Os tratamentos foram realizados com solução salina 0,9%, β -lapachona (50 mg/kg, 5 mg/kg e 1 mg/kg), e ceftriaxona (20mg/kg) ou Ertapenem (30mg/kg). Os animais sham foram submetidos a cirurgia sem indução de CLP e não receberam nenhum tratamento, assegurando assim que os dados obtidos refletem os efeitos do experimento em si e não uma consequência da cirurgia. Os animais foram eutanasiados com 12 horas, 24 horas ou 8 dias após o procedimento. Os órgãos foram extraídos, o exsudado peritoneal e o sangue coletados para a avaliação da migração leucocitária, avaliação da carga bacteriana, dosagem de óxido nítrico, avaliação da capacidade fagocítica, TEAC e MDA. Paralelo a este experimento, foi avaliado a sobrevivência de animais sépticos pré-tratados 24h e 0h da indução de sepse e tratados por 3 e 7 dias de 12 em 12 horas após a indução de sepse. Um delineamento experimental é demonstrado na Figura abaixo:

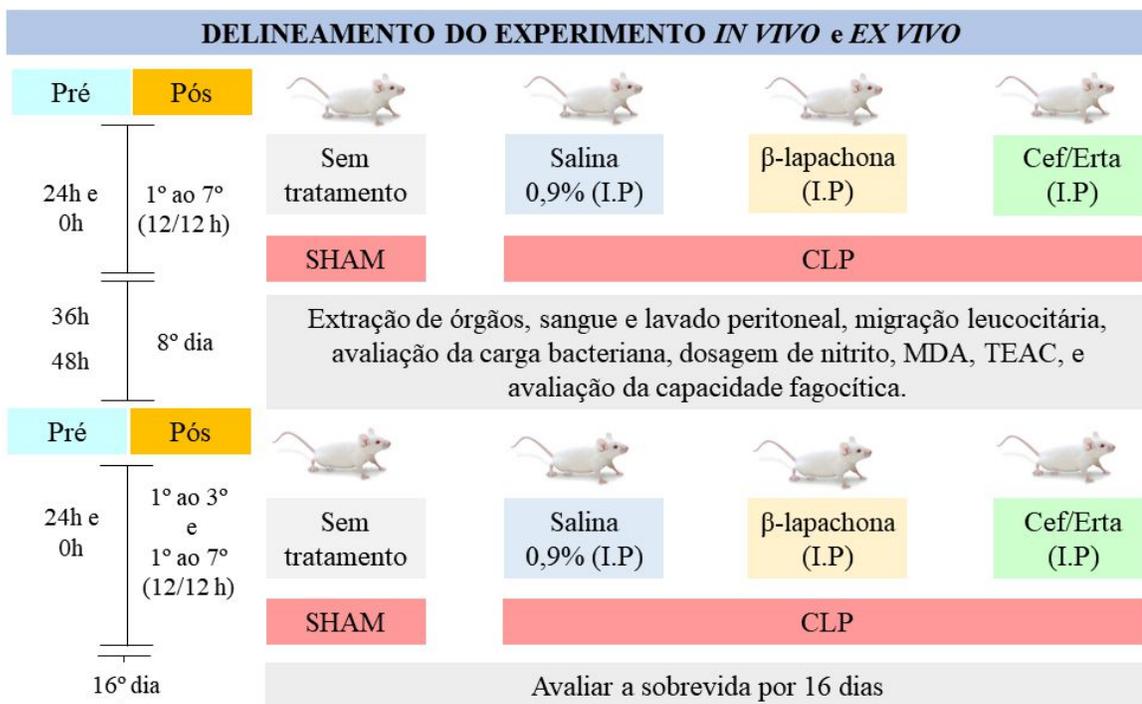


Figura 10: Delineamento experimental *in vivo*. Fonte: Autor

4.2.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para esse estudo os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- **GRUPO 1 (Controle-Sham):** Animais foram submetidos a exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da indução de sepse
- **GRUPO 2 (Controle-Salina):** Animais receberam tratamento com solução salina 0,9% estéril por via intraperitoneal (100uL), antes ou após indução de sepse;
- **GRUPO 3 (Controle- ATB):** Animais receberam tratamento com antibiótico Ceftriaxona (20mg/Kg) ou Ertapenem (30mg/Kg) por via intraperitoneal antes e após indução de sepse;
- **GRUPO 4(β -Lap-CLP):** Animais receberam tratamento de β -lapachona por via intraperitoneal antes ou após indução de sepse;

4.2.2 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 10-A) posteriormente foi realizada a depilação da parede abdominal, a assepsia do campo operatório com povidona e álcool a 70° (Figura 10-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 10-C).

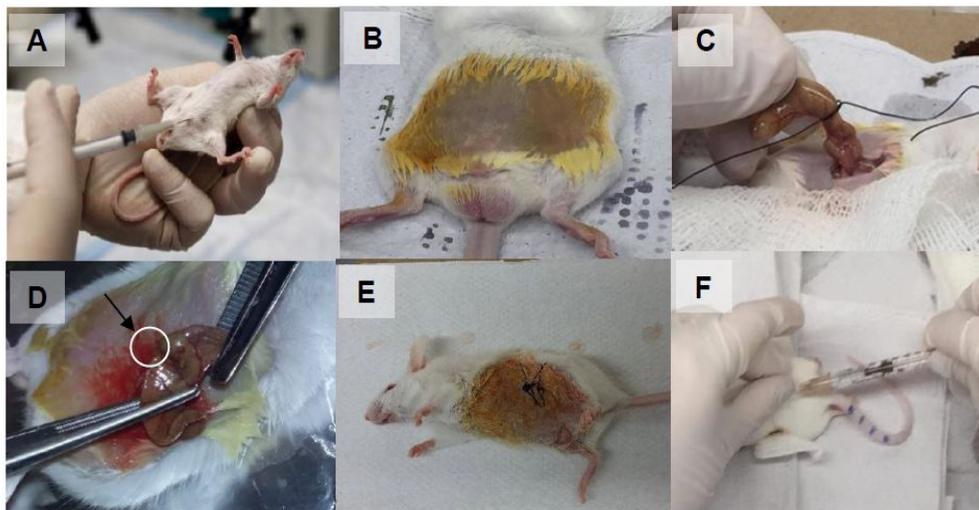


Figura 11: Procedimento da CLP. (A) Administração de 60 μ L anestésico por via intraperitoneal em camundongos Balb/C; (B) Assepsia da região abdominal com povidona e álcool 70° após a raspagem; (C) Ceco exteriorizado e a ligadura do ceco (D) Perfuração com agulha 18 gauss e exposição das fezes após a 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: Grupo Imunologia/LABEIM.

Após a ligadura, o coto isolado do ceco foi transfixado com a agulha de 18 gauges a partir do ponto de ligadura até a porção mais distal do ceco (Figura 10-D). O fio foi seccionado a um centímetro do ponto de saída, funcionando desse modo como dreno do conteúdo cecal para a cavidade peritoneal (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 10-E), posteriormente foi administrado 1 mL de solução salina estéril subcutâneo, para a reposição volêmica (Figura 10-F). Durante o tratamento foi ministrado Bupremorfina (0,05 a 0,1mg/kg) para as dores provenientes do procedimento cirúrgico. 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.

4.2.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

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

4.2.4 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL, SANGUE E ÓRGÃOS

4.2.4.1 Coleta do lavado peritoneal

Após a indução de CLP e tratamento, 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 centrifugação (5 minutos a 1500 RPM) e congelado em freezer -80°C até o momento das análises.

4.2.4.2 Coleta do sangue

Após a sedação foi realizada a coleta da amostra de sangue, por via intracardíaca, como demonstrado na figura 11, após indução de CLP. O volume total de sangue coletado foi colocado em tubos de vidro contendo EDTA para 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.

4.2.4.3 Coleta e preparo de órgãos

O baço, coração, fígado e pulmão foram coletados 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.

4.2.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Para avaliação da migração leucocitária realizada após CLP, fez-se a assepsia com álcool 70% do abdome dos animais e foram injetados 3 mL de PBS estéril contendo EDTA (1mM) na cavidade peritoneal. Posteriormente, o conteúdo foi 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 de lâminas contendo o lavado peritoneal preparado em citocentrífugado (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.

4.2.6 AVALIAÇÃO DA CARGA BACTERIANA

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as amostras coletadas após da CLP. Para a quantificação da carga bacteriana, foram retirados 100 µL do lavado peritoneal, sangue e do homogenado 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 (Figura 12).

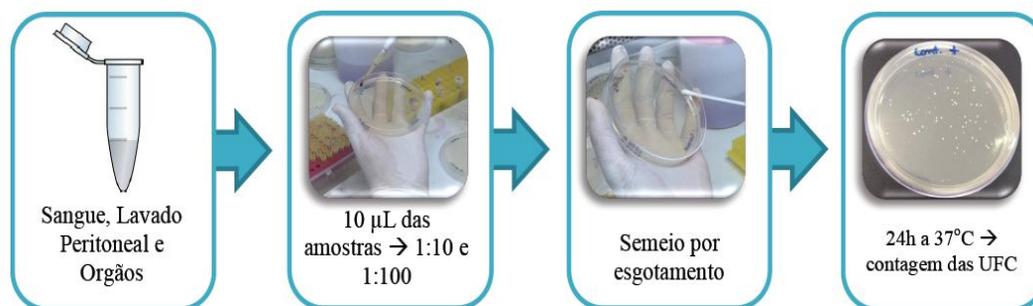


Figura 12: Esquema dos procedimentos para avaliação da carga bacteriana.

4.2.7 DOSAGEM DE ÓXIDO NITRICO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

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. A reação é controlada pelo tempo, e o produto é determinado após 10 minutos. Para tal, 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, Ertapenem e β -lapachona) após a CLP. Adicionou-se 100 μL do reagente de Griess e posteriormente foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e absorbância 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).

4.2.8 DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEIDO (MDA) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O MDA, importante biomarcador utilizado na avaliação do estresse oxidativo, foi determinado pela 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 μ l 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.

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

A avaliação da capacidade antioxidante total das 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. 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 (K₂S₂O₈; 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). Foram utilizadas 30 μ L das amostras do soro, sobrenadante do lavado peritoneal e dos órgãos (baço, coração, fígado, pulmão) de todos os grupos (Sham, Salina, Ceftriaxona ou ertapenem e β -lapachona) após a CLP. Os resultados foram expressos como TEAC no mmol de Trolox por quilograma.

4.2.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA

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 ou ertapenem e β -lapachona) foram coletados, e uma concentração de 2×10^5 céls/mL foram incubadas com $10 \mu\text{L}$ de Zymosan fixadas em vermelho neutro (1×10^8 partículas.mL⁻¹) por 30 minutos em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C. 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).

4.3 Testes *in vitro*

4.3.1 REAGENTES

Neste estudo foi utilizado meio de cultura DEMEN (dissolvido em de água destilada e adicionado Bicarbonato de Sódio em pó para ajuste pH 7,2) suplementado com soro bovino fetal (10%) e solução de antibiótico penicilina (1%) e solução de MTT (0,5 mg/mL).

4.3.2. 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. Fibroblastos pulmonares (MRC5) foram distribuído em microplacas de 96 poços, de fundo reto, células (1×10^4 células/mL) e incubadas por 24 horas em estufa de CO₂. Posteriormente, foram tratadas com β -lapachona em diferentes concentrações (0,125; 0,25; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00 μM). O peróxido orgânico TBHP (hidroperóxido de terc-butilo) foi utilizado como controle positivo.

Após 24 horas o meio de cultura foi retirado dos poços para então ser adicionado 100 μ L de MTT (0,5 mg/mL) e incubado novamente por 3 horas, em estufa de CO₂ a 37°C. Após este período o MTT foi retirado dos poços e adicionado a eles 100 μ L de DMSO puro para a dissolução dos cristais de formazan. Em seguida a placa foi levada ao agitador por 10 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro de microplacas à 560 nm (MOSMANN, 1983). O valor de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) foram determinados através de análise de regressão não linear utilizando-se o programa GraphPad Prisma. O peróxido orgânico TBHP (hidroperóxido de terc-butilo) foi utilizado como controle positivo.

4.4 Análise estatística

Todos os dados foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com correção pelo teste de Tukey. Os dados de cada grupo experimental serão expressos como a média desvio padrão. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Testes *in vivo* em animais pré-tratados

5.1.1 SOBREVIDA

Os resultados de sobrevivência demonstraram que os animais com sepse pré-tratados com salina foram a óbito no 5º a 6º dia após a indução de sepse, enquanto os animais com sepse pré-tratados com ceftriaxona (20 mg/kg) morreram no 7º dia. Por outro lado, todos (100%) os animais com sepse pré-tratados β-lapachona (50 mg/kg) sobreviveram até o 16º dia da avaliação, igual aos animais controles (grupo sham).

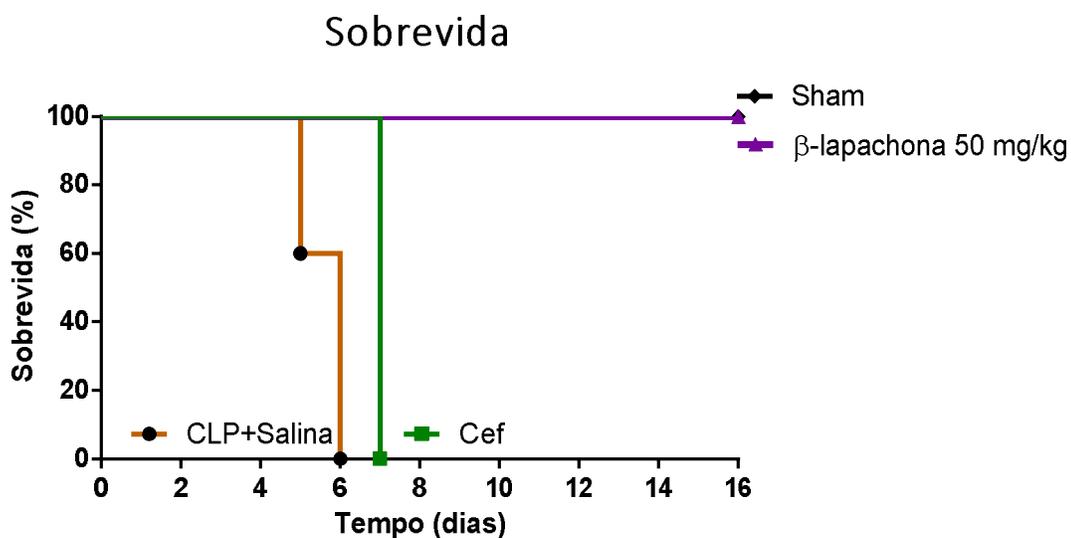


Figura 13: Taxa de sobrevivência dos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n= 5 por grupo): grupo Sham, sem tratamento e grupos com sepse (CLP) pré-tratados com ceftriaxona (20 mg/kg), salina 0,9% e β-lapachona (50 mg/kg). Foram observados quanto ao número de óbitos a cada 12 horas durante 16 dias.

5.1.2 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

O peso corporal dos animais sépticos ou não foi avaliado como indicativo de saúde. Os animais tiveram registrados o peso corporal em gramas de acordo com os tempos 0 (T0); 24 (T24); 36 (T36) e 48 horas (T48). Um aumento de peso corporal foi

observado no grupo sham de aproximadamente 21,5% do T0 ao T48. Todos os grupos submetidos ao CLP e pré-tratados tiveram redução de peso a partir de 24 horas da indução de sepse (grupo salina = redução de 16,6% no T36 e 41,10% no T48; grupo Cef= redução de 6% (T36) e 24%(T48). No entanto, o grupo β -lapachona apresentou uma redução menor do peso corpóreo (7,7% no T36 e 8,4% no T48) em relação ao controle (grupo Sham).

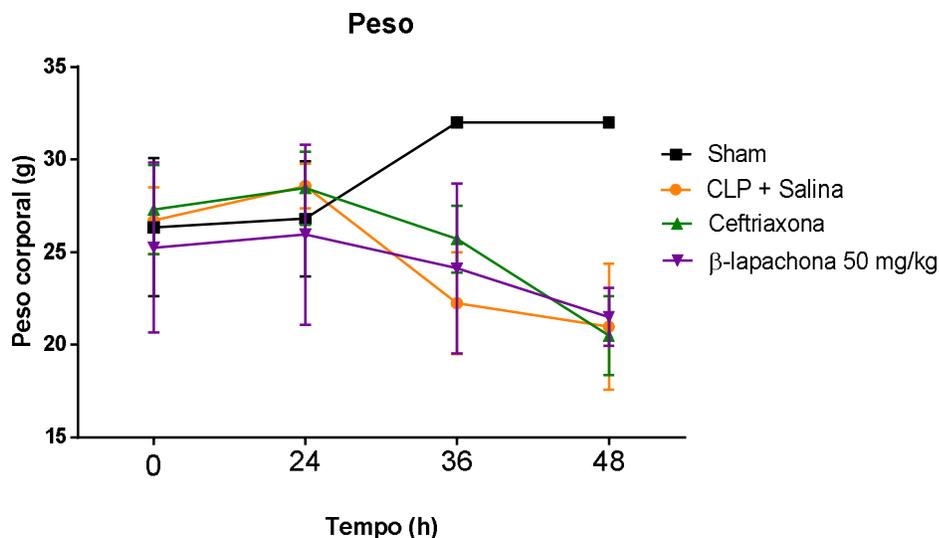


Figura 14: Peso corporal dos animais Sham e com sepse no decorrer do tempo. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e em modelo murinho de sepse pré tratados com: solução salina 0,9%, Ceftriaxona (20 mg/kg) e β -lapachona (50 mg/Kg). Resultados expressos como a média \pm d.p.

5.1.3 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

5.1.3.1. Lavado peritoneal

As figuras 15-A e 15-B mostram um aumento progressivo no número de neutrófilos no grupo CLP em relação ao grupo Sham, nos tempos 12 e 24 horas. Os animais CLP pré-tratados com β -lapachona não apresentaram alteração no número de neutrófilos nas primeiras 12 horas, somente em 24 horas, observou-se uma redução parcial significativa destas células em relação aos animais CLP tratados com salina. Por outro lado, os animais CLP pré-tratados com Ceftriaxona apresentaram potencialização no influxo de neutrófilos em 12 horas, e decaimento significativo

destas células em 24 horas em relação ao grupo CLP+salina, obtendo valores similares ao grupo controle.

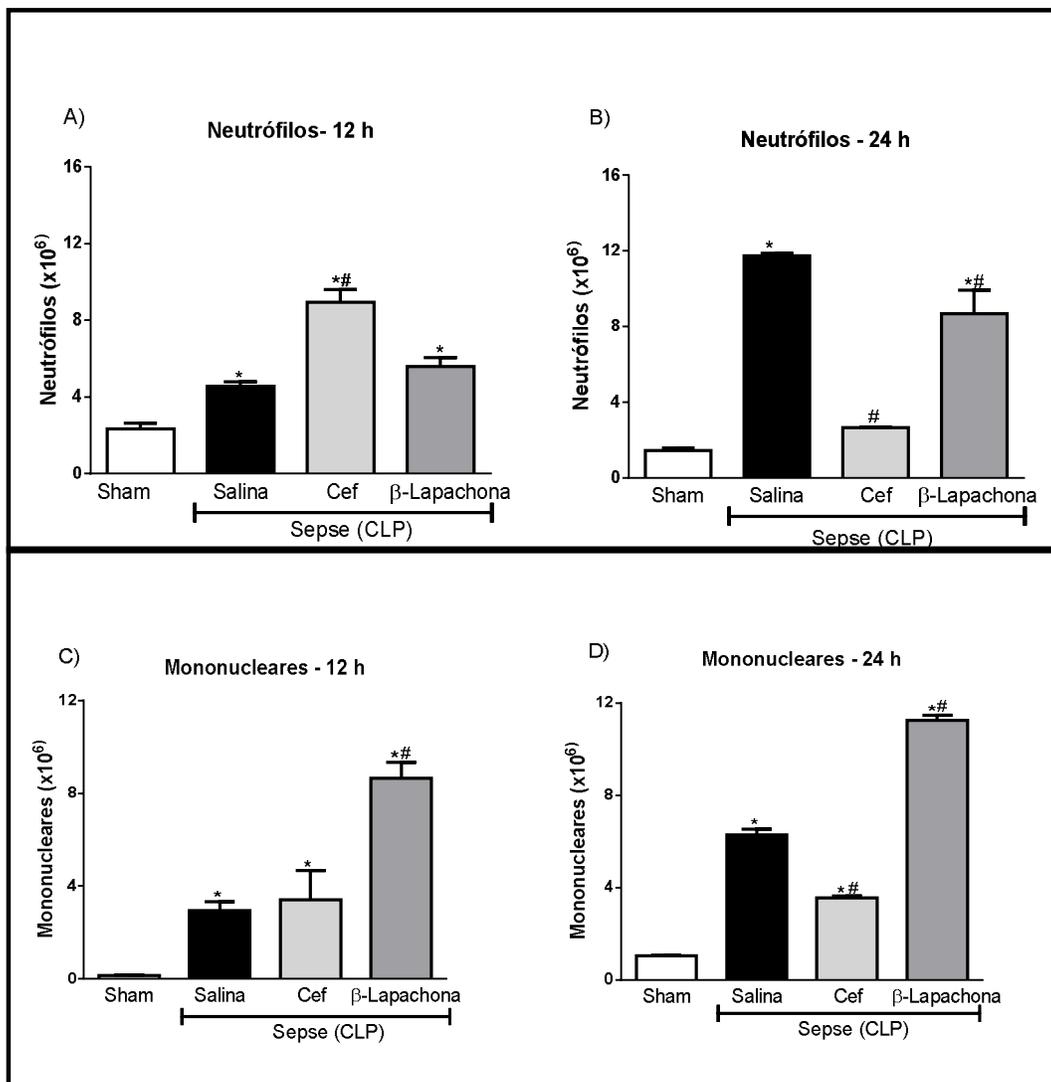


Figura 15: Migraç3o leucocit3ria nos animais com sepse. N3mero de neutr3filos e mononucleares circulantes no lavado peritoneal nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e em modelo murinho de sepse pr3 tratado com: soluç3o salina 0,9% , Ceftriaxona (20 mg/kg) e β -lapachona (50 mg/Kg). Neutr3filos (A) 12 horas 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.

Com relaç3o aos mononucleares, as figuras 15-C e 15-B mostram que o grupo CLP pr3-tratado com salina teve aumento de mononucleares nos tempos 12 e 24 horas em relaç3o ao grupo Sham. Enquanto, os animais CLP tratados com β -lapachona apresentaram potencializaç3o no recrutamento destas c3lulas para o foco infeccioso em comparaç3o com grupo CLP+salina no tempo de 12 e 24 horas.

Entretanto, o grupo CLP+Ceftriaxona apresentou números de mononucleares similares aos animais CLP+salina no tempo 12 horas, mas redução destas células no tempo 24 horas.

5.1.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA EM TECIDOS

A carga bacteriana foi quantificada em 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. O grupo Sham não apresentou bactéria em nenhum dos órgãos avaliados nos tempos de 12 e 24 horas. Por outro lado, observou-se uma elevada carga bacteriana no grupo CLP pré-tratado com salina tanto no lavado peritoneal quanto nos outros sítios avaliados. O grupo CLP pré-tratado com β -Lapachona no tempo de 12 horas apresentou carga bacteriana na maioria dos tecidos avaliados e no tempo de 24 horas não foi detectado carga bacteriana na maioria dos órgãos, com exceção do fígado que apresentou uma pequena quantidade de bactérias. No grupo CLP pré-tratado com ceftriaxona, observou-se um número reduzido de bactérias nos diferentes tecidos em relação ao grupo CLP+salina, encontrando-se apenas bactérias no baço e soro nos tempos avaliados (Tabela 04 e 05).

Tabela 04: Carga Bacteriana nos animais Sham e sépticos pré tratados com: solução salina 0,9%, Ceftriaxona (20 mg/kg) e β -lapachona (50 mg/Kg) após 12 horas da sepse induzida.

GRUPOS	UFC/mL-1 ($\times 10^3$)					
	Órgãos					
	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	Lav. Peritoneal	Soro
SHAM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salina + CLP	2,5 \pm 0,70	0,5 \pm 0,70	3 \pm 1,41	19,5 \pm 2,12	11,5 \pm 0,70	4,5 \pm 0,70
Cef + CLP	0,5 \pm 0,70	ND	ND	ND	ND	ND
B-Lap + CLP	4 \pm 1,30	11 \pm 2,30	ND	ND	1 \pm 0,50	1 \pm 0,70

ND: não detectado

Tabela 05: Carga Bacteriana nos animais Sham e sépticos pré tratados com: solução salina 0,9%, Ceftriaxona (20 mg/kg) e β -lapachona (50 mg/Kg) após 24 horas da sepse induzida.

GRUPOS	UFC/mL-1 ($\times 10^3$)					
	Órgãos					
	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	Lav. Peritoneal	Soro
SHAM	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salina + CLP	4,5 \pm 0,70	3,5 \pm 0,70	2 \pm 1,41	3 \pm 1,41	4 \pm 4,24	3,5 \pm 2,12
Cef + CLP	1,5 \pm 0,70	ND	ND	ND	ND	1 \pm 1,41
B-Lap + CLP	ND	ND	1 \pm 0,40	ND	ND	ND

ND: não detectado

5.1.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO

5.1.6.1 Produção de óxido nítrico no soro e lavado peritoneal

Na figura 16A, observou-se que, no soro, todos os animais CLP submetidos aos diferentes pré-tratamentos apresentaram aumento na produção de NO em 12 horas. Entretanto, no tempo de 24 horas, somente os grupos CLP pré-tratados com salina e Ceftriaxona continuavam com a acentuada produção de NO, enquanto que os animais CLP pré-tratados com β -lapachona apresentaram níveis de NO similares ao grupo sham. No lavado peritoneal, os animais CLP pré-tratados com salina apresentaram aumento de NO neste tecido, enquanto nos animais CLP pré-tratados com β -lapachona, observou-se níveis de NO similares ao grupo sham (Figura 16B e 16D).

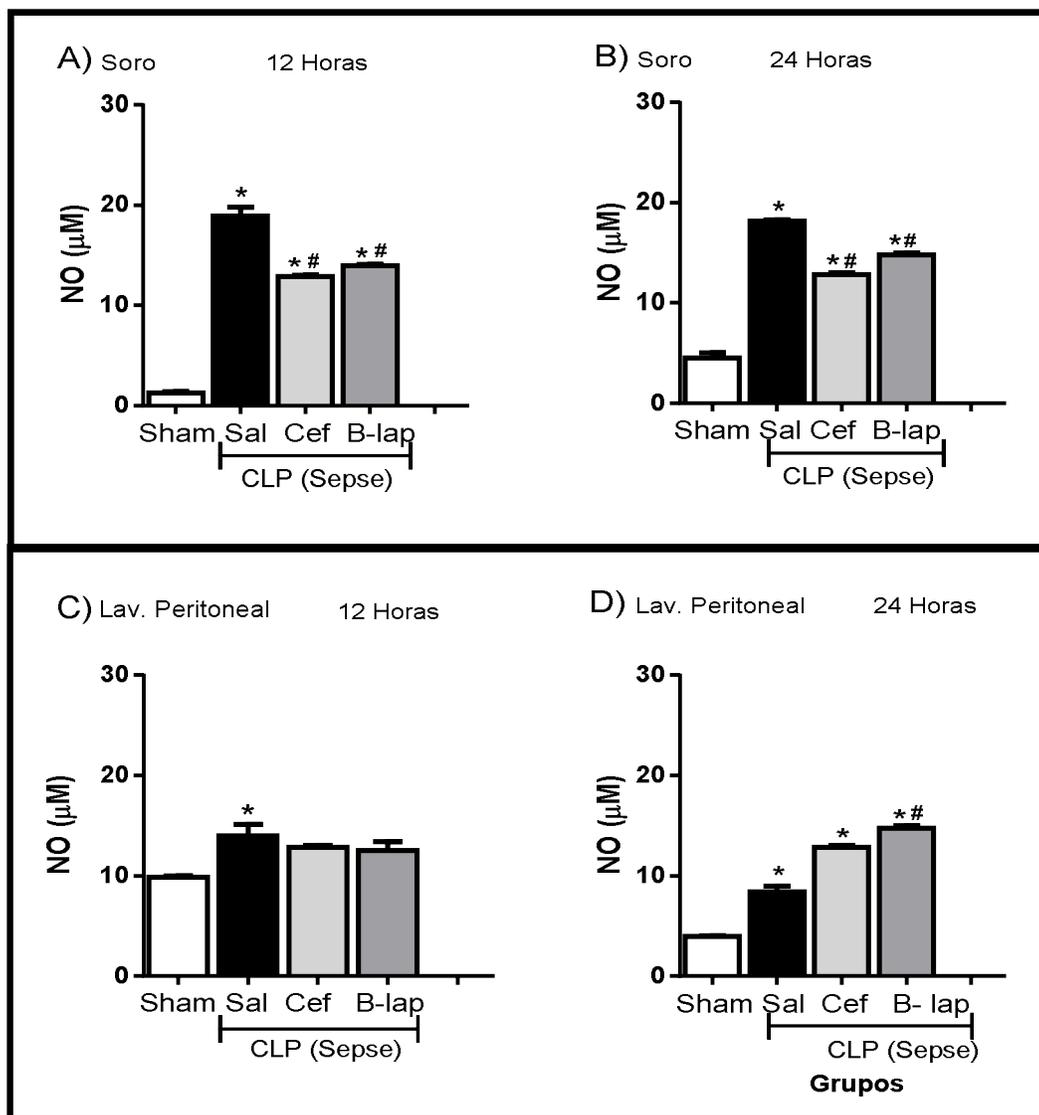


Figura 16: Produção de óxido nítrico nos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), β -lapachona (50 mg/Kg). Produção de NO no soro (A) 12 horas após 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

5.1.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO (MDA)

5.1.7.1 Produção de MDA no soro e lavado peritoneal

A figura 17 mostra que os animais com sepse tratados com salina apresentaram níveis elevados de MDA no soro e lavado em todos os tempos avaliados

em relação ao grupo sham. Por outro lado, o pré-tratamento de animais CLP com β -lapachona levou a uma redução nos níveis MDA em relação ao grupo CLP+salina no soro e lavado nos tempos avaliados (Figura 17). Os animais CLP tratados com ceftriaxona também obtiveram uma diminuição nos níveis de MDA no soro e lavado peritoneal em todos os tempos avaliados.

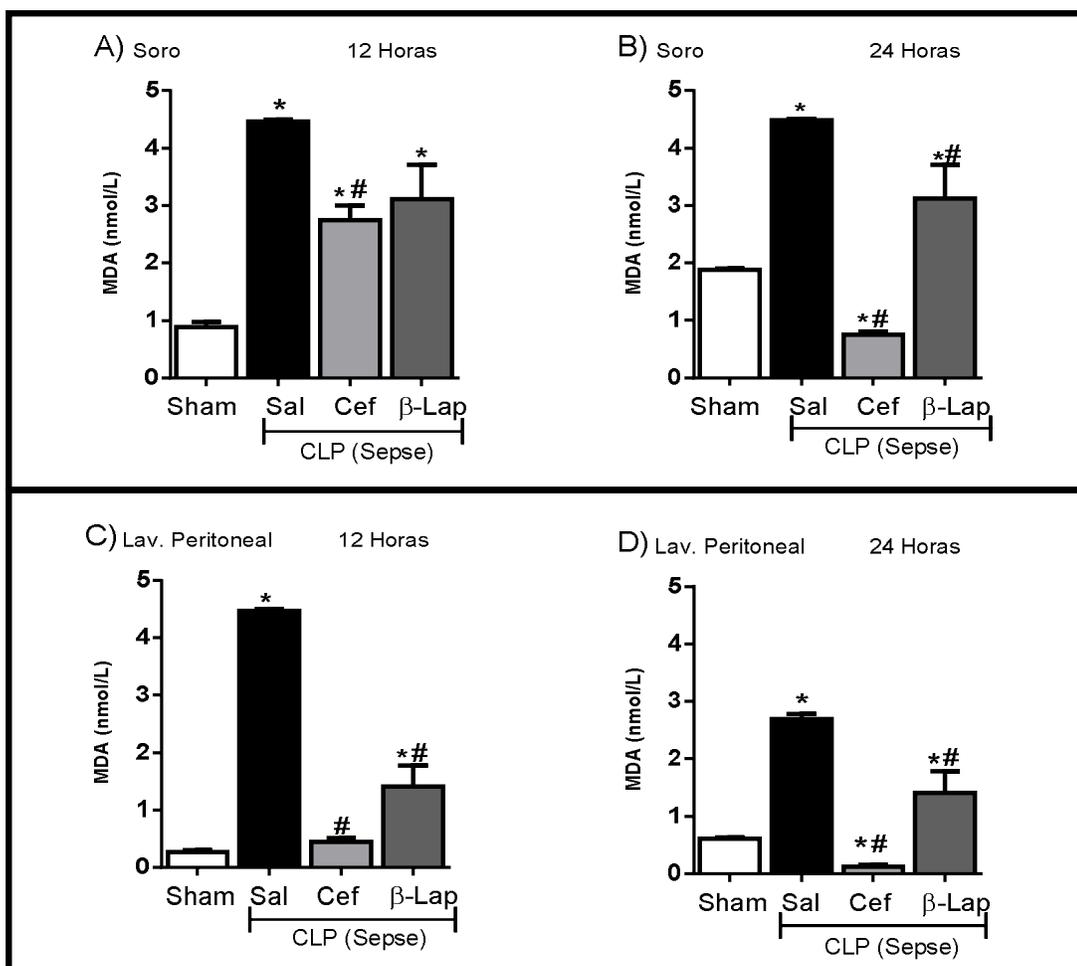


Figura 17: Produção de MDA no soro e peritônio de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), β -lapachona (50 mg/Kg). Produção de MDA no soro (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; Produção de MDA 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

5.1.7.2 Produção de MDA nos tecidos

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram aumento significativos nos níveis de MDA em todos os órgãos e tempos avaliados (Figura 18A e 18B). O pré-tratamento com β -lapachona nos animais com sepse alterou os níveis de MDA na maioria dos órgãos comparado aos animais CLP+salina nos tempos avaliados. Por outro lado, o grupo CLP pré-tratados com Ceftriaxona apresentou redução nos níveis de MDA no coração e pulmão comparado aos animais CLP+salina nos tempos avaliados (Figura 18A e 18B).

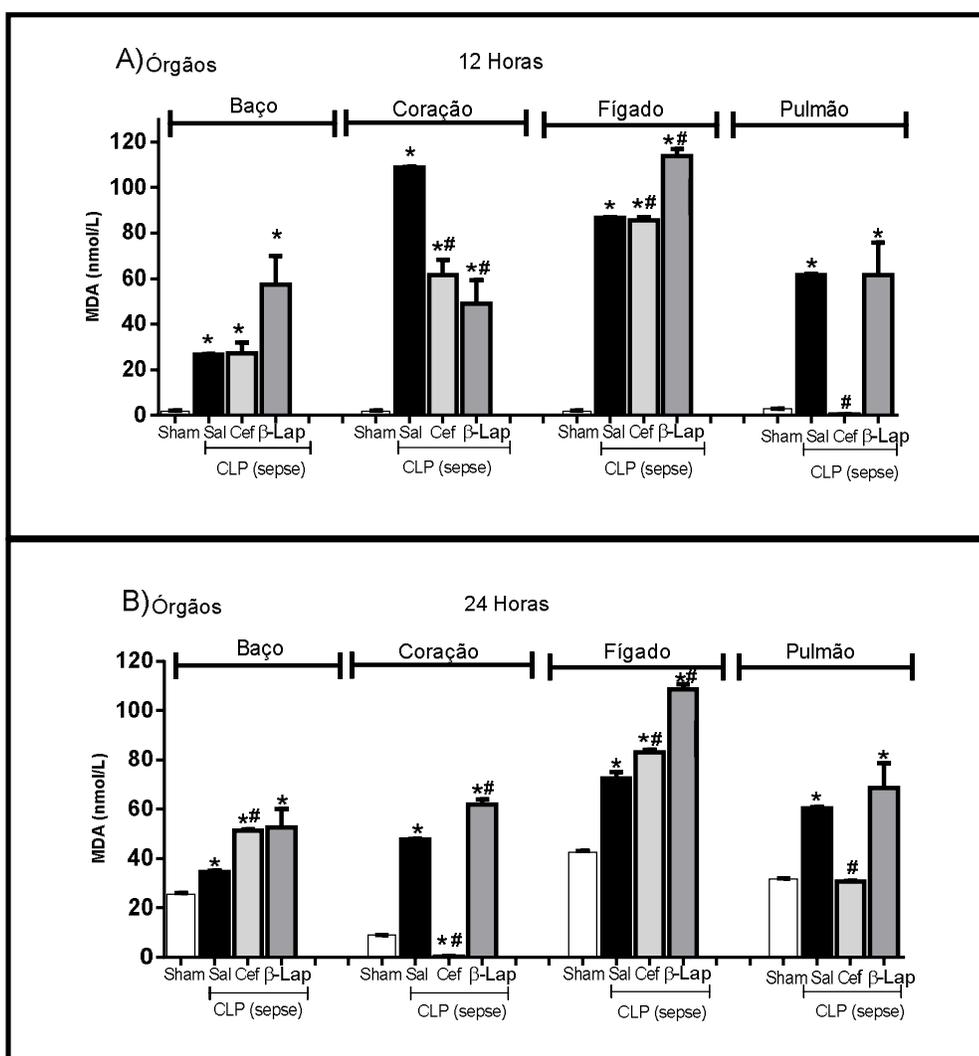


Figura 18: Produção de MDA nos órgãos dos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), β -lapachona (50 mg/Kg). Produção de MDA nos tecidos (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina

5.1.8 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE TEAC

5.1.8.1 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, mas não no soro, em 24 horas. No soro, os tratamentos (ceftriaxona e β -lapachona) nos animais CLP não alteraram os níveis de TEAC comparado aos animais CLP+salina nos tempos avaliados (Figura 19 A e B). Todos os pré-tratamentos (ceftriaxona e β -lapachona) nos animais CLP foram capazes de elevar os níveis dos antioxidantes no lavado peritoneal em 12 horas, comparado aos animais CLP+salina. No entanto, em 24 horas, somente o pré-tratamento com β -lapachona manteve os níveis aumentados no peritônio (Figura 19 C e D).

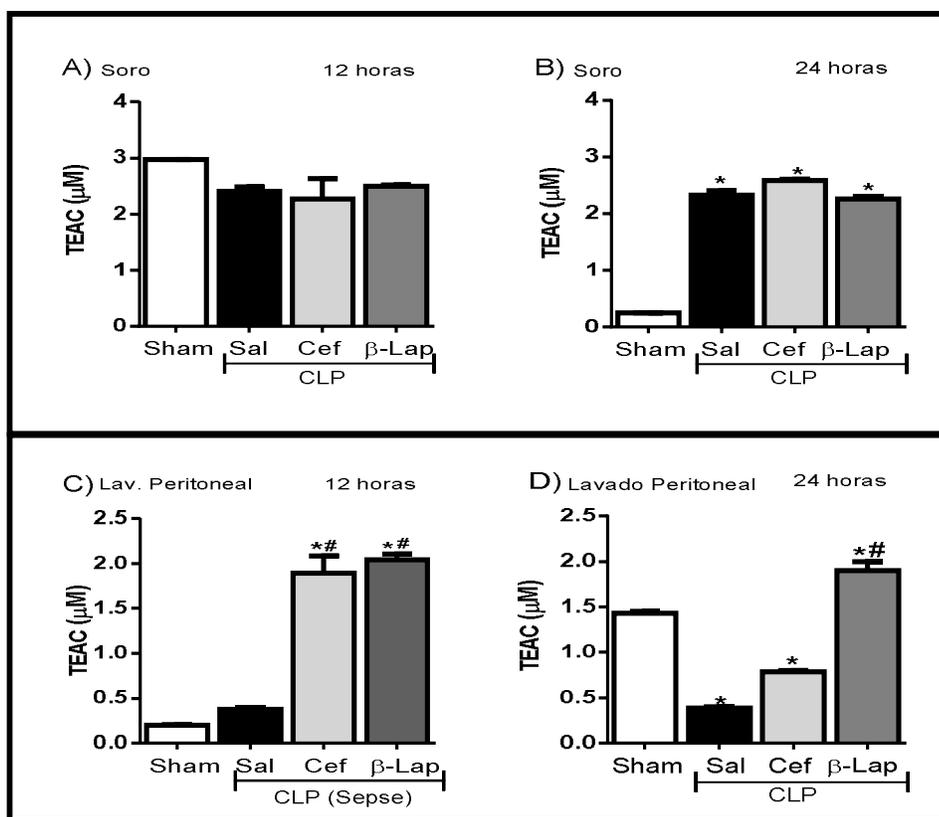


Figura 19: Capacidade antioxidante total nos sangue e peritônio dos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), β -lapachona (50 mg/Kg). Níveis de antioxidantes no soro (A) 12 horas após a CLP (B) 24 horas após a CLP; Níveis de antioxidantes 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.

5.1.8.2 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 em comparação com o grupo Sham. O grupo CLP pré-tratado com β -lapachona apresentou níveis elevados de TEAC na maioria dos órgãos (baço, fígado e pulmão), principalmente no tempo de 24 horas comparado ao grupo CLP+salina (Figura 20 B). O grupo CLP+ceftriaxona não apresentou alteração nos níveis de TEAC comparado aos animais CLP+salina.

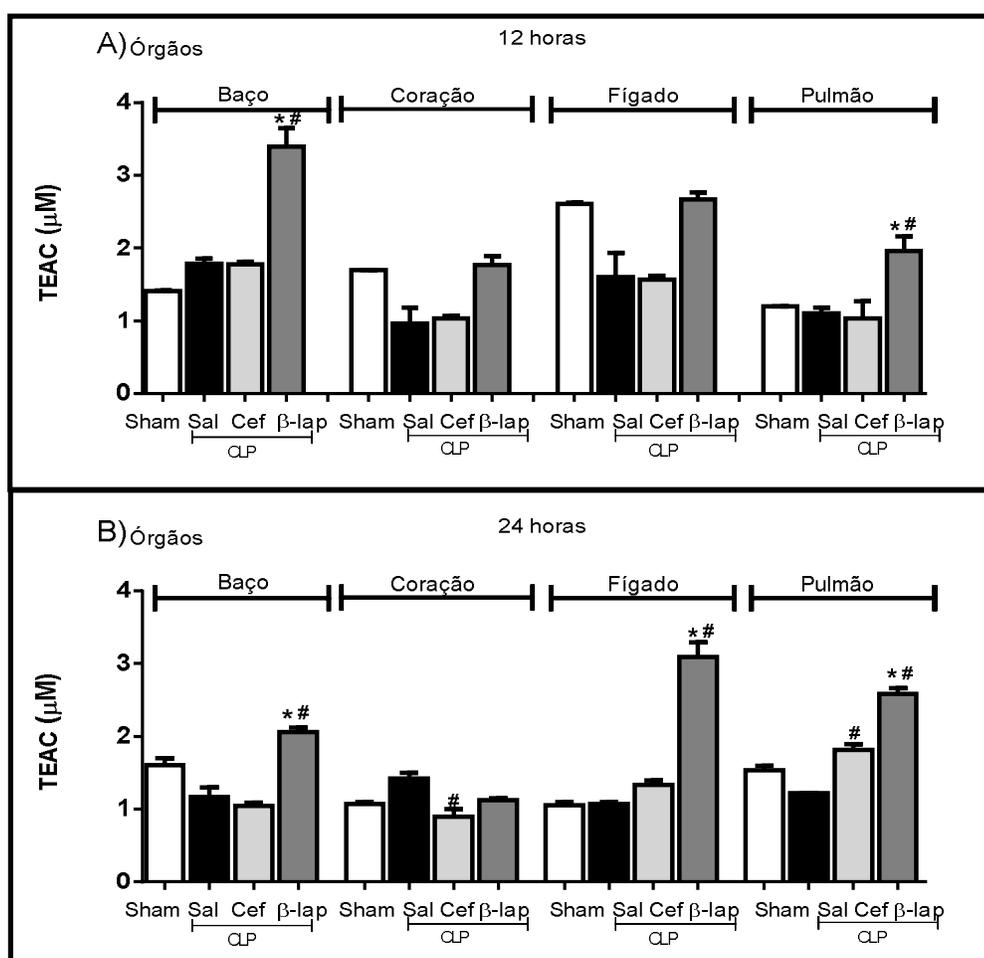


Figura 20: Capacidade antioxidante total nos órgãos dos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (20 mg/kg), β -lapachona (50 mg/Kg). Níveis de antioxidantes 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.

5.1.9 CAPACIDADE FAGOCÍTICA DOS LEUCÓCITOS PERITONEAIS *ex vivo*

A atividade fagocítica dos leucócitos foi avaliada a partir das células obtidas do lavado peritoneal dos animais com sepse tratados com salina ou Ceftriaxona ou β -lapachona. As células dos animais com CLP+salina foram capazes de fagocitar as partículas de zymozan, entretanto as células dos animais CLP pré-tratados com β -lapachona apresentaram potencialização na capacidade fagocítica comparado ao grupo CLP+ salina (Figura 21).

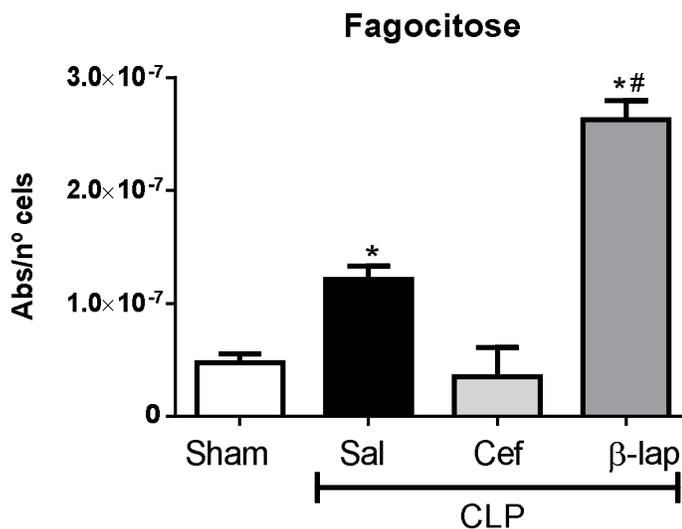


Figura 21: Capacidade Fagocítica dos animais com sepse. Leucócitos provenientes dos animais sham, e dos animais com sepse pré-tratados com Ceftriaxona (20 mg/kg), β -lapachona (50 mg/Kg) foram removidos após 24 horas da CLP e incubados com partículas de Zymosan (5×10^6) e atividade fagocítica foi avaliada em espectrofotômetro. * $p < 0,05$ comparado ao controle Sham, # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina e $\delta p < 0.05$ comparado ao grupo ceftriaxona

5.2 Testes in vivo em animais pós-tratados com as doses de β -lapachona (5 mg/kg e 1 mg/kg)

5.2.1 SOBREVIDA

Os dados abaixo avaliaram a sobrevivência dos animais com sepse pós-tratados com uma maior dose de β -lapachona (5 mg/kg), ou com uma menor dose de β -lapachona (1 mg/kg). A figura 22 mostra ainda que todos os animais com sepse pós-tratados com salina foram a óbito no 1º e 2º dia, enquanto 50% dos animais pós-tratados com β -lapachona (5 mg/kg) e 60% dos animais pós-tratados na menor dose de β -lapachona (1 mg/kg) sobreviveram até pelo menos o 16º dia após a indução da sepse. Todos os animais do grupo sham (100 %) e 55% dos animais com sepse pós-tratados com ertapenem (30 mg/kg) sobreviveram pelo menos 16 dias.

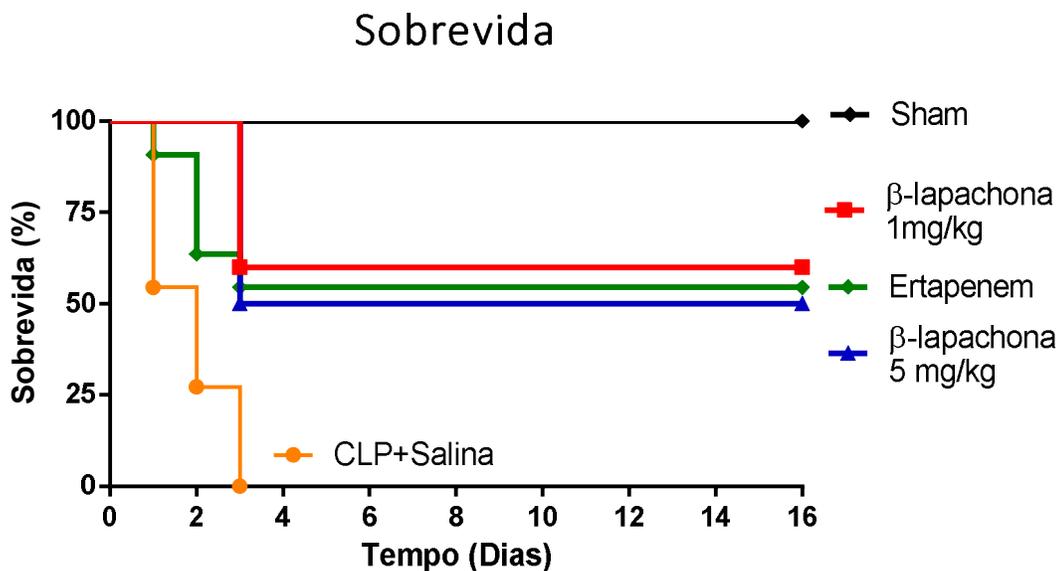


Figura 22: Taxa de sobrevivência dos animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n= 5 por grupo): grupo Sham, sem tratamento e grupos com sepse (CLP) pré-tratados com ertapenem (30 mg/kg), salina 0,9%, β -lapachona (5 mg/kg) e β -lapachona (1 mg/kg). Foram observados quanto ao número de óbitos a cada 12 horas durante 16 dias.

5.2.2 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

5.2.2.1. Lavado peritoneal

As figuras 23-A mostra um aumento de neutrófilos nos animais CLP pós-tratados com salina em relação ao grupo sham, 7 dias após a indução de sepse. No entanto, os animais CLP pós-tratados com β -lapachona (1 mg/kg) apresentaram uma redução no número desta célula comparado ao grupo CLP+salina. Os animais controles (sham) e grupo CLP+Ertapenem não apresentaram influxo de neutrófilos para o foco infeccioso após 7 dias da indução de sepse.

Em relação aos mononucleares, os animais CLP pós-tratados com salina apresentaram aumento de mononucleares em relação ao grupo Sham, 7 dias pós CLP. Enquanto, o pós-tratamento com β -lapachona nos animais CLP levou a redução no recrutamento destas células para o foco infeccioso comparado ao grupo CLP+salina, mas obteve resultados similares ao grupo pós-tratado com ertapenem (Figura 23 B).

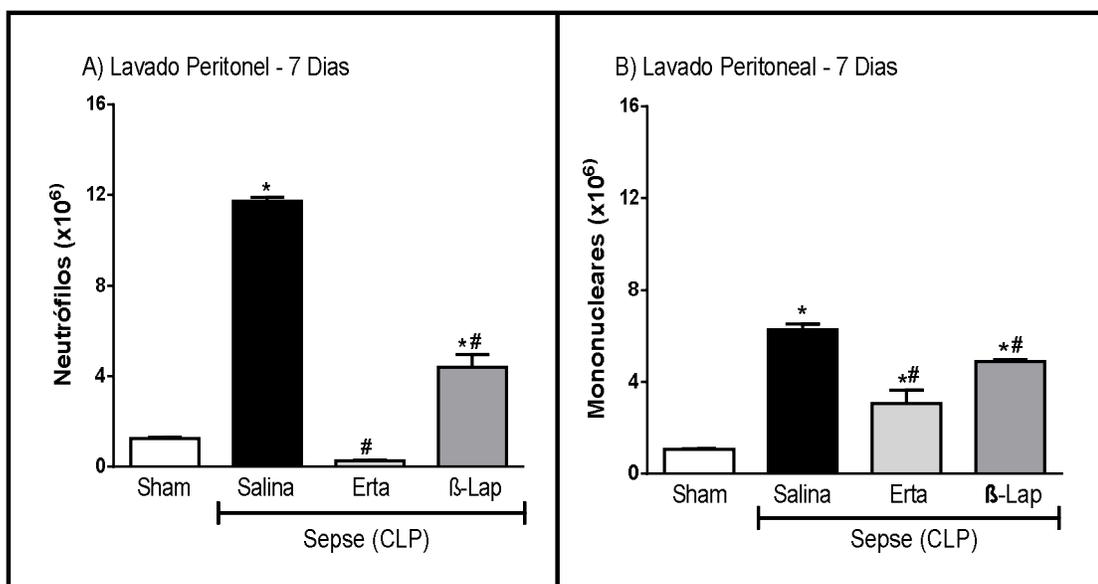


Figura 23: Migração leucocitária nos animais com sepse. Número de neutrófilos e mononucleares circulantes no lavado peritoneal nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e em modelo murinho de sepse pré tratados com: solução salina 0,9%, Ertapenem (20 mg/kg) e β -lapachona (1mg/Kg). Neutrófilos (A) 7 dias após a CLP; Mononucleares (B) 7 dias após CLP. * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina. ANOVA de medidas repetidas. Grupo controle salina 24 horas após CLP.

5.2.3 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO

5.2.3.1 Produção de óxido nítrico no soro e lavado peritoneal

A figura 24-A mostra um aumento na produção de NO no soro e lavado de animais CLP pós-tratados com salina em relação ao grupo Sham, 7 dias após indução de CLP. No entanto, o pós-tratamento com β -lapachona (1 mg/kg) nos animais CLP levou uma redução nos níveis de NO no lavado, mas não no soro, comparado aos animais CLP+salina. Por outro lado, o pós-tratamento com Ertapenem levou uma redução de NO no soro, mas aumento de NO no lavado em relação ao grupo CLP+salina, 7 dias após a indução de sepse.

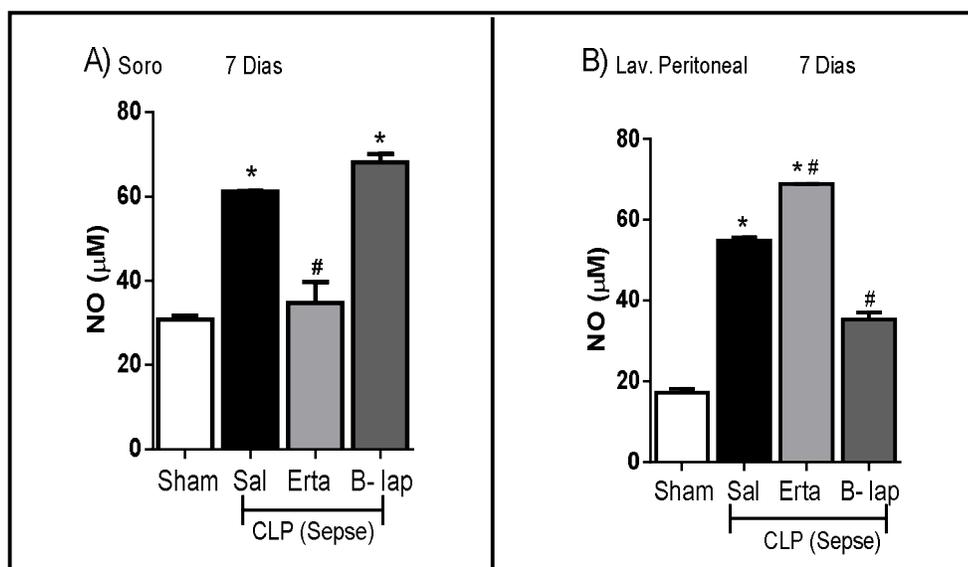


Figura 24: Produção de NO no soro e lavado peritoneal de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ertapenem (30 mg/kg), β -lapachona (1 mg/Kg). (A) Produção de NO no soro 7 dias após a CLP; (B) Produção de NO no lavado peritoneal 7 dias após CLP; (D) 24 horas da CLP; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina. Grupo controle salina 24 horas após CLP.

5.2.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO (MDA)

5.2.4.1 Produção de MDA no soro, lavado peritoneal e tecidos

Todos os animais com sepse pós-tratados com salina ou β -lapachona (1 mg/kg) ou ertapenem apresentaram aumento significativo nos níveis de MDA no soro e lavado peritoneal, 7 dias após CLP (Figura 25 A e B).

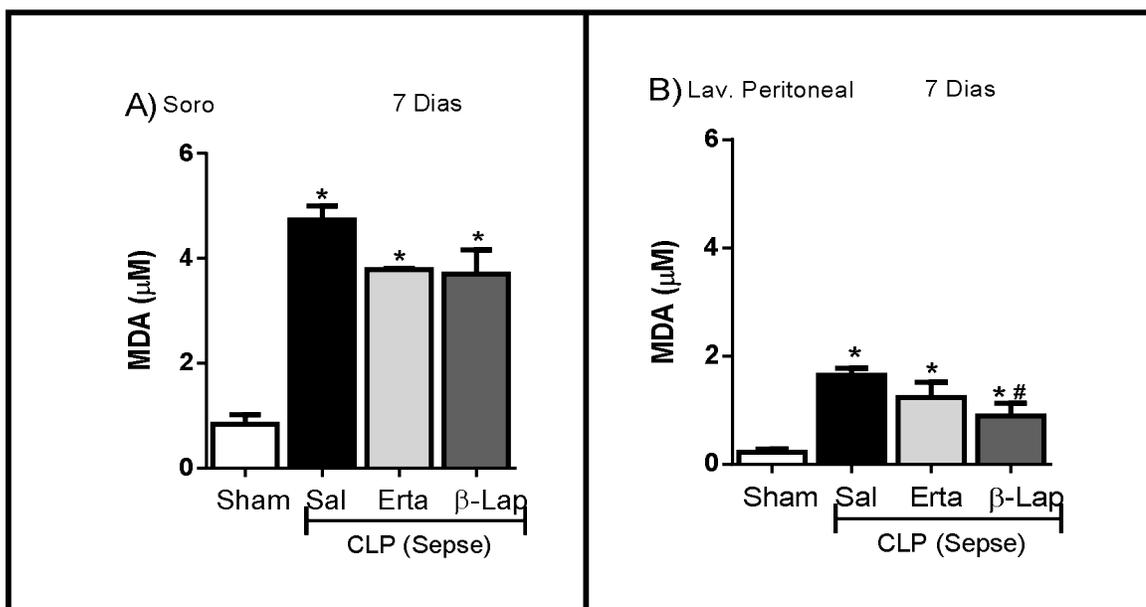


Figura 25: Produção de MDA no soro e lavado peritoneal de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ertapenem (30 mg/kg), β -lapachona (1 mg/Kg). (A) Produção de MDA no Soro 7 dias após CLP; (B) Produção de MDA no lavado peritoneal 7 dias após CLP; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina. Grupo controle salina 24 horas após CLP.

5.2.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE TEAC

5.2.5.1 Capacidade antioxidante total no soro, lavado peritoneal e órgãos

Os animais com sepse pós-tratados com salina apresentaram aumento na capacidade antioxidante total (TEAC) no soro, mas redução no lavado peritoneal e na maioria dos tecidos avaliados, 7 dias após CLP. O pós-tratamento com β -lapachona (1 mg/kg) nos animais CLP elevou os níveis dos antioxidantes no lavado e todos os órgãos avaliados comparado aos animais CLP+salina (Figura 26).

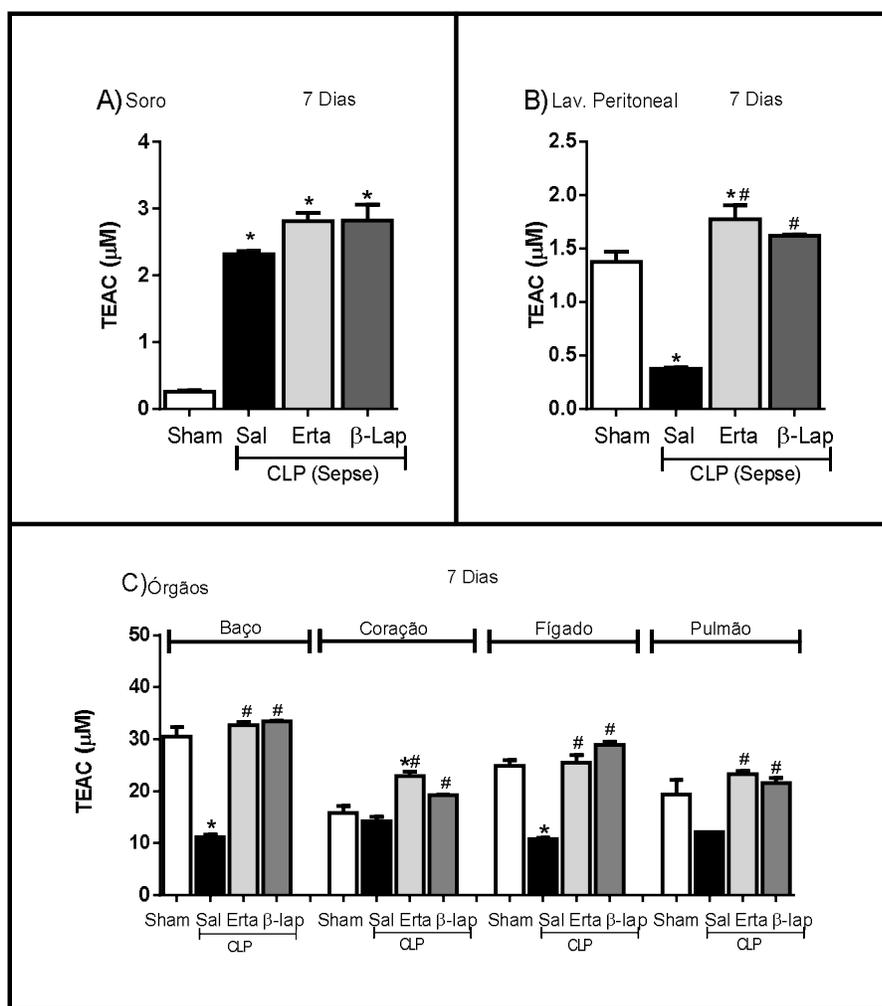


Figura 26: Produção de TEAC no soro, lavado peritoneal e órgãos de animais com sepse. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1-grupo Sham e os demais tiveram sepse (CLP) e foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ertapenem (30 mg/kg), β -lapachona (1 mg/Kg). (A) Produção de TEAC no Soro 7 dias após CLP; (B) Produção de TEAC no lavado peritoneal 7 dias após CLP; (C) Produção de TEAC nos órgãos 7 dias após CLP; * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina. Grupo controle salina 24 horas após CLP.

5.3 Teste *in vitro*

5.3.1 CITOTOXICIDADE CELULAR

A citotoxicidade foi avaliada em fibroblastos derivados de tecido pulmonar (MRC5) através do ensaio de MTT, que foram tratadas com diferentes concentrações de β -lapachona: (0,125; 0,25; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00 μM) por 24 horas. A figura 27 mostra que a concentração de 1,00 μM de β -lapachona reduziu em 16% a viabilidade das células MRC5, enquanto a partir da concentração de 2,00 μM houve 82% de morte celular.

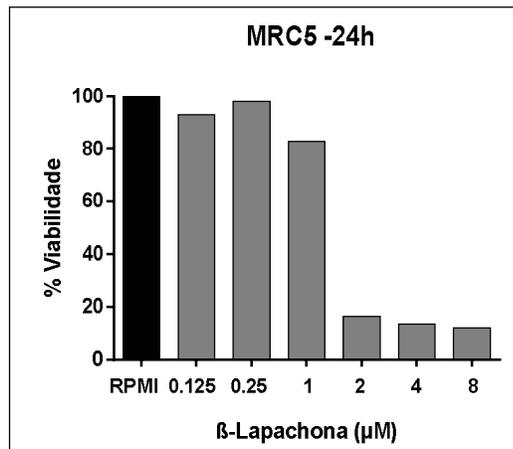


Figura 27: Viabilidade celular fibroblastos derivados de tecido pulmonar expresso em porcentagem (%), após incubar por 24 horas os extratos aquosos de *A. brasiliensis* nas concentrações de 0,125; 0,25; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00 μM de β -lapachona

O valor de IC₅₀ (concentração necessária capaz de inibir 50% do crescimento celular) de β -lapachona foi de $1,81 \pm 0,19 \mu\text{M}$ em 24 horas.

Tabela 06: Valor de IC₅₀ em μM necessária para β -Lapachona inibir a proliferação de fibroblastos derivados de tecido pulmonar (MRC5).

	IC ₅₀ (μM)
β -Lapachona	$1,81 \pm 0,19$

6. DISCUSSÃO

O modelo de ligadura e punção do ceco "cecal ligation and puncture" (CLP) é amplamente utilizado na busca por terapias alternativas mais se assemelhar a progressão da sepse humana (DEJAGER et al. 2011). A perfuração do ceco resulta em contaminação bacteriana endógena para o peritônio e em seguida na corrente sanguínea. A invasão bacteriana culmina em ativação da resposta inflamatória, choque séptico e disfunção de órgãos com morte subsequente (HOLLENBERG et al. 2001; DOERSCHUG et al. 2004; DEJAGER et al. 2011). Os sintomas típicos da sepse como hipotermia, taquicardia e taquipnéia são encontrados em roedores submetidos a CLP (FINK, 2001; RITTIRSCH et al., 2009)

Em nosso estudo avaliamos alguns parâmetros que indicam o estado geral de saúde dos animais tais como sobrevivência e peso corporal, além de parâmetros imunológicos e oxidativos após a indução de sepse nos animais (NEMZEK et al. 2008; MORAAL et al. 2012; GRANGER et al. 2013). Nos testes nos animais com o pré-tratamento foi utilizado o antibiótico ceftriaxona como controle de tratamento, visto que este fármaco usualmente reconhecido como seguro e eficaz quando usada como um único medicamento na terapia de sepse (OMS, 2008).

Em relação aos animais com sepse que receberam o pré-tratamento com salina, nossos dados mostram que estes animais apresentaram perda significativa de peso corporal, com morte no sexto dia após a CLP. Segundo Conn (2008) e Bejamim et al. (2000), o modelo de CLP pode sobreviver até 5 dias após o procedimento cirúrgico. Em modelo de alta gravidade de sepse, utilizado em nossos experimentos, geralmente todos os camundongos morrem dentro de 4 dias após a indução da CLP, em que o início da sepse ocorre por volta de 12 h após o CLP (RITTIRSCH et al., 2009).

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 pré-tratados e pós-tratados com salina, observou-se aumento no influxo de neutrófilos e mononucleares para o sítio inflamatório, 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.

Como já mencionado anteriormente, o modelo CLP é caracterizado pela translocação bacteriana, com consequente 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).

Em nosso estudo, os animais com sepse pré-tratados com salina apresentaram aumento da produção de NO pelos leucócitos no soro, no lavado peritoneal e nos demais tecidos avaliados 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). O NO junto com seus produtos gerados pela sua interação com outros intermediários irão atuar como microbicidas (KAPLAN et al. 1996; OCUIN et al. 2011). Os efeitos deletérios do NO são demonstrado na literatura, sendo que a produção excessiva NO por iNOS pode levar a hipotensão e colapso vascular com consequente disfunção de órgãos e mortalidade precoce (TITHERADGE, 1999).

Além disso, o excesso de ERON 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. Na sepse alterações patológicas podem ocorrer em muitos órgãos, sendo que os mais comumente afetados são os pulmões, fígado, rins, coração e intestinos (OIKONOMOPOULOU et al., 2012).

Os animais possuem um sistema antioxidante enzimático e não enzimático que atuam contra radicais livres e outros oxidantes (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 aumento da capacidade fagocítica. Corroborando, 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 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.

Em nosso estudo foi demonstrado uma ação protetora de β -lapachona sobre a resposta inflamatória em animais submetidos a sepse por CLP. Quando os animais receberam injeção intra-peritoneal de β -lapachona e posterior indução sepse, houve aumento da sobrevivência dos animais em relação aos animais com sepse tratados com salina, conferindo resistência à infecção. Neste estudo, observamos uma taxa de sobrevivência de 100% dos animais pré-tratados com β -lapachona até pelo menos por 16 dias após a cirurgia CLP. Entretanto, pode-se observar uma redução de 8,4% no peso dos animais a partir de 48 horas após indução de sepse.

Nossos dados também mostraram que o pré-tratamento com β -lapachona modulou a inflamação em modelo de sepse, diminuindo a migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Estudos realizados por CRACIUN et al. (2010) observou que 24 horas após a CLP os camundongos que vão a óbito têm mais neutrófilos no peritônio em comparação com aqueles que vão viver. Os neutrófilos dos camundongos que vão a óbito possuem crescimento bacteriano descontrolado que haja visto que são menos capazes de matar bactérias, seja por causa da redução da fagocitose, redução da atividade de conteúdo granular ou redução do burst oxidativo. Além disso, o recrutamento e ativação dos neutrófilos pode promover além de depuração danos ao tecido através da liberação de proteases e radicais livres. (WALLEY et al., 1997). Estudos realizados por Ness et al. (2003) mostraram em modelo CLP que a inibição do recrutamento de neutrófilos resultou no retardamento da inflamação e consequente proteção contra de lesões da sepse.

Por outro lado, o pré-tratamento com β -lapachona nos animais com sepse induziu aumento de mononucleares no lavado peritoneal. Dentre as células mononucleares, os macrófagos atuam na remoção de bactérias nas fases iniciais da sepse, sendo estes responsáveis tanto pela regulação de pró-inflamação (M1) quanto na regulação anti-inflamatória (M2). A modulação de polarização M1 / M2 é fundamental para controlar a infecção e ao mesmo tempo evitar danos em tecidos (LI et al., 2014). Segundo Kim et al. (2009) relataram que o extrato de *Tabebuia avellanedae* modulou negativamente a resposta celular diminuindo a migração de macrófagos e monócito através da inibição da expressão de moléculas de adesão. A alteração da resposta encontrada em nossos estudos pode estar relacionada ao fato do extrato de *Tabebuia* possuir diferentes compostos ativos, dentre eles naftoquinonas, antraquinonas, cumarinas e flavonoides que podem regular negativamente a expressão de moléculas de adesão e recrutamento celular.

A carga bacteriana nos animais pré-tratados com β -lapachona com sepse foi reduzida substancialmente em relação ao grupo sepse pré-tratado com salina, visto que somente uma baixa carga bacteriana foi encontrada no fígado após 24 horas. O fígado representa a primeira linha de defesa contra bactérias provenientes do intestino (HINES; SON; KREMER, 2010). Nesse sentido, a depuração da circulação portal melhorada neste grupo pode ter levado a ausência de bactérias nos demais sítios de infecção. Dados da literatura também relatam a atividade antibacteriana de naftoquinonas, como a β -lapachona, que está relacionada com a indução de estresse

oxidativo no tecido. Dessa forma, a função mitocondrial e parede celular bacteriana podem ser afetadas pela geração de radicais livres (PEREIRA et al., 2006). Estudos *in vitro* demonstraram que β -lapachona possui uma ação sinérgica em cepas de MRSA quando em combinação com agentes β -lactâmicos (MACEDO et al., 2013).

Constata-se também que β -lapachona não alterou níveis de NO no sítio inflamatório nos dois tempos avaliados, um efeito benéfico haja visto que o NO é composto nocivo para bactérias. Por outro lado, no soro houve redução dos níveis de NO no tempo de 24 horas quando comparado ao grupo salina. Estudos *in vivo* já tem demonstrado que β -lapachona pode agir reduzindo níveis de NO e citocinas pró-inflamatórias. Esse efeito pode estar relacionado em parte com a alteração de sinalização da via MyD88, resultando na inibição da liberação de óxido nítrico, através da síntese do óxido nítrico induzível ativada por NF-kB (LEE et al., 2015; SITÔNIO et al., 2013).

Por outro lado, nossos dados mostram que β -lapachona intensificou o aumento de MDA, principalmente em órgãos como fígado e pulmão. A biodegradação de β -lapachona é bastante extensa no fígado e intestino antes alcançara circulação sistêmica (KIM et al., 2015). Além disso, estudos indicam que as naftoquinonas podem exercer sua toxicidade por interação direta com macromoléculas celulares ou por sua capacidade de formar radicais livres, espécies ativas de oxigênio e redox ciclo ou por inibição de mitocôndrias e transportes de elétrons (DOHERTY; RODGERS; COHEN, 1987). Estudos realizados por verificaram danos no fígado de ratos que receberam doses intraperitoneais de 40, 80 e 160 mg/kg de β -lapachona pelo aumento significativo nos níveis de Gamaglutamiltransferase (GGT), transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e fosfatase alcalina.

Neste estudo os níveis de antioxidantes endógenos estavam elevados no lavado peritoneal nos dois tempos e nos órgãos 24 horas após CLP dos animais pré-tratados com β -lapachona em comparação com os animais CLP tratados com salina. Estudos realizados por PARK et al., 2016 demonstraram que β -lapachona aumentou os níveis intracelulares das enzimas antioxidantes tais como catalase e glutathione em astrócitos primários de ratos. Tal mecanismo pôde ser atribuído relacionado ao fator 2 (Nrf2) por sinalização de elemento de resposta antioxidante (ARE) (LEE et al., 2015).

Além disso, as células provenientes do lavado peritoneal dos animais sépticos pré-tratados com β -lapachona apresentaram aumento significativo da capacidade de fagocitar partículas de zymosan. Como relatado anteriormente, a β -lapachona possui

elevada capacidade de induzir a geração de EROS. Os EROS desempenham um papel crítico na modulação de fagocitose atuando como importantes moléculas de sinalização (VERNON; TANG, 2013). Estudos anteriores demonstraram que células U937 tratadas com oridonina, um indutor de EROS, tiveram capacidade aumentada de fagocitar células apoptóticas (ZANG et al., 2012).

Dessa forma, a β -lapachona demonstrou ser capaz de prevenir danos causados pela sepse em modelo animal. No entanto, houve necessidade de avaliar doses menores de β -lapachona neste modelo de sepse, em vista de possível toxicidade na dose utilizada (50 mg/kg) apresentada pelo aumento de MDA e perda de peso dos animais. Estudos realizado por KUMI-DIAKA; TOWNSEND (2003) constaram um possível efeito citotóxico dose-dependente de β -lapachona em modelo animal. A exposição de espermatozoides a concentrações maiores de β -lapachona causou alterações na membrana celular e prejudicou processos intracelulares significativos que levam à dano e inibição da reação acrossômica, enquanto que concentrações mais baixas estimulavam a reação acrossômica.

Mediante a toxicidade da β -lapachona e uma melhor adequação do tratamento clínico em sepse, avaliou-se o efeito do pós-tratamento com β -lapachona em doses menores (5mg/kg e 1mg/kg), sobre alguns parâmetros como sobrevida, migração e parâmetros oxidativos, afim de obter uma dose com menor toxicidade e mesmo efeito protetor frente a sepse. Nossos dados mostraram que o pós-tratamento com a dose de 1 mg/kg de β -lapachona por 7 dias foi mais eficaz em elevar a sobrevida dos animais com sepse (60% sobrevida) em relação aos demais grupos tratados. Com isso, os demais parâmetros foram avaliados nestes animais (β -lapachona 1mg/kg), nos quais observou-se redução de neutrófilos e níveis aumentos de antioxidantes totais, mas não houve alteração de NO e MDA, nestes animais pós-tratados com β -lapachona após 7 da indução de sepse.

Esta redução de neutrófilos induzida pela β -lapachona pode estar associada a resolução da inflamação, mediante a inibição da biossíntese de mediadores que regulam o recrutamento de neutrófilos para o tecido, assim como elevam o clearance de neutrófilos apoptóticos, promovendo a homeostase tecido (SUGIMOTO et al., 2016). Além disso, a β -lapachona não alterou os níveis de NO, fato que pode explicar a morte de 40% dos animais com sepse pós-tratados com β -lapachona, visto que este mediador pode contribuir para a hipotensão, cardiodepressão e hiporreatividade vascular. Outro importante parâmetro importante que não foi alterado pela β -

lapachona foram os níveis de MDA, que podem ter sido gerados pela combinação de de superóxido e óxido nítrico nos animais com sepse, levando a maior produção de peroxinitrito e outros reativos tóxicos, como espécies de nitrogênio (RNS). A presença de MDA e outros reativos aldeídos no sangue podem alterar a permeabilidade e prejudicar as receptores e enzimas de membranas levando a danos em estruturas e funções proteicas. Desta forma, aldeídos liberados no sangue são marcadores de estresse oxidativo e indicativos de danos celulares (BRACHT et al., 2005).

Com relação as reservas antioxidantes, o pós-tratamento com β -lapachona levou de maneira geral um aumento de TEAC nos animais com sepse. Como discutido anteriormente, a β -lapachona pode induzir a expressão gênica em vias de Nrf2, elevando assim os níveis de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione peroxidase (GPx). Os níveis aumentados destas enzimas conferem proteção em células sob condições de estresse (VÍCTOR et al., 2009).

Com relação a viabilidade celular in vitro, a concentração de $1\mu\text{M}$ de β -lapachona manteve 82% dos fibroblastos de origem pulmonar viáveis, no entanto, a concentração de $2,00\mu\text{M}$ foi capaz de matar mais de 84% destas células, obtendo um valor de IC50 de $1,81 \pm 0,19\mu\text{M}$. A literatura relata que a β -lapachona é capaz de induzir morte em uma variedade de células cancerosas (KIM et al., 2007; MENACHO-MÁRQUEZ et al., 2015). Estudos recentes demonstram que um dos principais mecanismos de morte é a bioativação de β -lapachona por NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1(NQO1) (WU et al., 2016). A atuação de β -lapachona como substrato cria um ciclo redox com alta geração de EROS provocando uma necrose programada (chamada "necroptose") (BIAN et al., 2014). Pesquisas referentes as células não cancerosas são escassos, porém, Byun et al. (2014) demonstraram um efeito citoprotetor com redução de morte induzida por TNF- α de células endoteliais.

7- CONCLUSÃO

Os animais com sepse apresentaram diminuição na sobrevivência, e o pré-tratamento destes animais com β -lapachona em maior dose elevou a sobrevivência em 100%, enquanto que o pós-tratamento com menor dose levou a sobrevivência em 60%.

A sepse induziu aumento de neutrófilos e mononucleares, e pré-tratamento com a β -lapachona reduziu o influxo de neutrófilos e aumentou o número de mononucleares em ambos tratamentos.

Os animais com sepse apresentaram elevada carga bacteriana no lavado peritoneal, soro e em todos os tecidos coletados, caracterizando uma infecção polimicrobiana. O pré-tratamento destes animais com β -lapachona diminuiu a carga bacteriana na maioria dos tecidos avaliados.

A sepse induziu elevada produção de NO e MDA nos vários tecidos avaliados. O pré-tratamento com β -lapachona diminuiu a produção de NO e MDA no soro, porém elevou os níveis de MDA em alguns tecidos. O pós-tratamento com β -lapachona em doses mais baixas não alterou os níveis de NO e MDA.

Os animais com sepse apresentaram redução de defesas antioxidantes nos avaliados. O pré-tratamento com β -lapachona elevou os níveis de antioxidantes no soro e na maioria dos tecidos avaliados. O pós-tratamento com β -lapachona conseguiu elevar ainda mais os níveis de antioxidantes nos sítios avaliados.

A β -lapachona mostrou efeito citotóxico *in vitro*, em baixas concentrações

Desta forma, em geral o pré-tratamento de β -lapachona em maior dose obteve melhores resultados com ação imunomoduladora frente a sepse, apesar da possível toxicidade na dose utilizada (50 mg/kg). Enquanto que o pós-tratamento com dose de 1 mg/kg do composto não alterou alguns parâmetros oxidativos, somente elevou os níveis de antioxidantes. O pré-tratamento em maiores doses de β -lapachona iniciado antes do início da sepse, isto é, tratamento profilático, contrasta com a situação em que o tratamento em menores doses do composto é iniciado após o início da sepse (tratamento terapêutico).

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; BRETT, A. M. O. Reduction of Lapachones in Aqueous Media at a Glassy Carbon Electrode. p. 29–34, 2002.

AIRES, A. D. L. et al. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 261–267, 2014.

ALVES, G. M. C. et al. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA β -LAPACHONA E ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS CRISTAIS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 413–416, 2008.

ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and Septic Shock. **N Engl J Med**, v. 369, n. 1, p. 840–51, 2013.

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.

ARCHANA , SURESH JATAWA, R. P. AND A. Indian Medicinal Plants: A Rich Source of Natural Immuno-Modulator. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 198–205, 2011.

AZIZ, M. et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 3, p. 329–42, 2013.

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.

BERMEJO, M.; ISABEL, V. M. Enhancing Oral Absorption of β -Lapachone : Progress Till Date. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, 2016.

BIAN, J. et al. 2-Substituted 3-methylnaphtho[1,2-b]furan-4,5-diones as novel L-shaped ortho-quinone substrates for NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, n. May, p. 56–67, 2014.

BLANCO, E. et al. NIH Public Access. v. 70, n. 10, p. 3896–3904, 2011.

BOSMANN, M.; WARD, P. A. The Inflammatory Response in Sepsis. v. 34, n. 3, p. 129–136, 2014.

BOYD, J. H.; RUSSELL, J. A.; FJELL, C. D. The meta-genome of sepsis: Host genetics, pathogens and the acute immune response. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 3, p. 272–283, 2014.

BRACHT, H. et al. Nitric Oxide Synthase Inhibition in Sepsis? Lessons Learned from Large-Animal Studies. **CRITICAL CARE AND TRAUMA**, n. 12, p. 488–498, 2005.

BYEON, S. E. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 145–152, 2008.

BYUN, S. J.; SON, Y.; PAE, H.-O. Cytoprotective effect of β -lapachone by inducing heme oxygenase-1 expression and AMP-activated protein kinase activation in human endothelial cells. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 18, n. 7, p. 949–58, 2014.

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

CAVALCANTE, F. A. et al. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, ?? and ??-lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 183–189, 2008.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332–340, 2011.

CAWCUTT, K. A.; PETERS, S. G. Severe sepsis and septic shock: Clinical overview and update on management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 11, p. 1572–1578, 2014.

CHAO, C. Y. et al. Anti-inflammatory effect of momordica charantia in sepsis mice. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12777–12788, 2014.

CHEN, N.-J. et al. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. **Nature**, v. 446, n. 7132, p. 203–7, 2007.

CHUN, K. et al. Sepsis Pathogen Identification. **J.Lab Autom.**, v. 20, n. 2211–0682 (Electronic), p. 539–561, 2015.

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

COHEN, J. et al. Sepsis: A roadmap for future research. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 581–614, 2015.

CRACIUN, F. L.; SCHULLER, E. R.; DANIEL, G. Early Enhanced Local Neutrophil Recruitment in Peritonitis-Induced Sepsis Improves Bacterial Clearance and Survival. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 6930–6938, 2010.

CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R.; BOVERIS, A. Generation of Superoxide Anions and Hydrogen Peroxide from β -Lapachone in Bacteria. v. 14, n. 4, p. 630–633, 1978.

DANIEL G. REMICK, M. . Pathophysiology of sepsis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 170, n. 5, p. 1435–1444, 2002.

DE GROOTH, H.-J. et al. SOFA and mortality endpoints in randomized controlled trials: a systematic review and meta-regression analysis. p. 1–9, 2017.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, 2011.

DELLINGER, R. P. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. **Crit Care Med**, v. 35, p. 1244–1250, 2007.

DIENER, K. R. et al. The multifunctional alarmin HMGB1 with roles in the pathophysiology of sepsis and cancer. **Immunology and cell biology**, v. 91, n. 7, p.

443–50, 2013.

DOHERTY, A.; RODGERS, A.; COHEN, G. M. Mechanisms of Toxicity of 2- and 5-Hydroxy-1, 4- Naphthoquinone ; Absence of a Role for Redox Cycling in the Toxicity of 2-Hydroxy- 1, 4 = Naphthoquinone to Isolated Hepatocytes. v. 7, n. September 1986, p. 123–129, 1987.

DU, L. et al. Photoconversion of ??-Lapachone to ??-Lapachone via a Protonation-Assisted Singlet Excited State Pathway in Aqueous Solution: A Time-Resolved Spectroscopic Study. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 15, p. 7340–7350, 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.

FINK, M. P. **63 - Animal Models of Sepsis and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome.** [s.l.] Elsevier Inc., 2001.

FLOREA LUPU, RAVI S. KESHARI, JOHN D. LAMBRIS, AND K. M. C. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. **Thrombosis Research**, v. 133, n. 5, p. 724–732, 2014.

FREITAS, A. E. et al. NMDA receptors and the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway are implicated in the antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 11, p. 1030–1038, 2013.

GALLEY, H. F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British Journal of Anaesthesia**, v. 107, n. 1, p. 57–64, 2011.

HENKIN, C. S. et al. Sepsis : uma visão atual. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p. 135–145, 2009.

HOOKER, C. The Constitution of Lapachol and its Derivatives. Part V, The Structure of Patemb's " Iso1apiehone. v. 68, n. 8, p. 1190–1197, 1936.

HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. June, p. 16045, 2016.

JANTAN, I.; AHMAD, W.; BUKHARI, S. N. A. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. August, p. 1–18, 2015.

JEON, Y.-J. et al. Beta-Lapachone Suppresses Non-small Cell Lung Cancer Proliferation through the Regulation of Specificity Protein 1. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 9, p. 1302–1308, 2015.

JEONG, M. H. et al. β -Lapachone ameliorates lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

JUNG, E.; SOOK, K.; KYU, T. Chemico-Biological Interactions • β -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, n. 1–2, p. 37–44, 2011.

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

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.

KAYMAK, C.; BASAR, H.; SARDAS, S. Reactive Oxygen Species (Ros) Generation in Sepsis. p. 41–47, 2012.

KENDRICK, S. F. W.; JONES, D. E. J. Mechanisms of Innate Immunity in Sepsis BT - Sepsis. **Sepsis**, n. Chapter 2, p. 5–10, 2008.

KIM, I. et al. Preclinical pharmacokinetic evaluation of β -lapachone: Characteristics of oral bioavailability and first-pass metabolism in rats. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 296–300, 2015.

KIM, M. G.; JEON, J. H.; LEE, H. S. Larvicidal activity of the active constituent isolated from *Tabebuia avellanedae* bark and structurally related derivatives against three mosquito species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 45, p.

10741–10745, 2013.

KIM, S. O. et al. Induction of Egr-1 Is Associated with Anti-Metastatic and Anti-Invasive Ability of β -Lapachone in Human Hepatocarcinoma Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2169–2176, 2007.

KUMI-DIAKA, J.; TOWNSEND, J. Toxic Potential of Dietary Genistein Isoflavone and β -Lapachone on Capacitation. v. 6, n. 3, p. 201–208, 2003.

LÁSZLÓ, I. et al. Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

LEE, E.-J. et al. β -Lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 133, 2015.

LEE, M. H. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects in animal models of an ethanolic extract of Taheebo, the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 4, p. 791–796, 2012.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Coagulation and sepsis. **Thrombosis Research**, v. 149, p. 38–44, 2017.

LI, Y. et al. Low-dose cisplatin administration to septic mice improves bacterial clearance and programs peritoneal macrophage polarization to M1 phenotype. p. 111–123, 2014.

LUSTOSA, A. K. M. F. et al. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon rainforest. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 77–82, 2016.

MACEDO, L. et al. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 25–29, 2013.

MARKIEWSKI, M. M.; DEANGELIS, R. A; LAMBRIS, J. D. Complexity of complement activation in sepsis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 6, p. 2245–

2254, 2008.

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

MAZZIO, E. A. et al. Natural product HTP screening for antibacterial (E.coli 0157:H7) and anti-inflammatory agents in (LPS from E. coli O111:B4) activated macrophages and microglial cells; focus on sepsis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 467, 2016.

MELAMED, A.; SORVILLO, F. J. The burden of sepsis-associated mortality in the United States from 1999 to 2005: an analysis of multiple-cause-of-death data. **Critical care (London, England)**, v. 13, n. 1, p. R28, 2009.

MENACHO-MÁRQUEZ, M. et al. EIF2 kinases mediate β -lapachone toxicity in yeast and human cancer cells. **Cell Cycle**, v. 14, n. 4, p. 630–640, 2015.

MOSSIE, A. PATHOPHYSIOLOGY OF SEPSIS Flow chart SEPSIS : TERMS AND DEFINITIONS. v. 1, n. 8, p. 159–168, 2013.

NEILL, L. A. J. O.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 6, p. 453–460, 2013.

OIKONOMOPOULOU, K. et al. Interactions between coagulation and complement—their role in inflammation. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 1, p. 151–165, 2012.

OUGH, M. et al. Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 1, p. 95–102, 2005.

PARK, J. S. et al. β -Lapachone increases phase II antioxidant enzyme expression via NQO1-AMPK/PI3K-Nrf2/ARE signaling in rat primary astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 97, p. 168–178, 2016.

PEREIRA, E. M. et al. *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal

irritability analysis. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 5, p. 5, 2006.

PINHEIRO DA SILVA, F.; NIZET, V. Cell death during sepsis: Integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 509–521, 2009.

PINTO, A. V. et al. Schistosomiasis mansoni: blocking of cercarial penetration by chemical agents: I. Naphtoquinones and derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, n. 2, p. 133–135, 1977.

PONTES, A. C. A. A. Nanocápsulas de e gordura de murumuru contendo β -Lapachona: preparação, caracterização e atividade citotóxica. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém.

PRUCHA, M.; ZAZULA, R.; RUSSWURM, S. Immunotherapy of Sepsis : Blind Alley or Call for Personalized Assessment ? p. 37–49, 2017.

RAYMOND, S. L. et al. Microbial Recognition and Danger Signals in Sepsis and Trauma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2017a.

RAYMOND, S. L. et al. Microbial recognition and danger signals in sepsis and trauma ☆. **BBA - Molecular Basis of Disease**, 2017b.

RECIO, C.; ANDÚJAR, I.; RÍOS, J. L. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2088–2103, 2012.

RITTIRSCH, D. et al. Functional roles for C5a receptors in sepsis. **Nat Med**, v. 14, n. 5, p. 551–557, 2008.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat protoc**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 10, p. 776–787, 2008.

SEYMOUR, C. W. et al. Assessment of clinical criteria for sepsis for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 762–

SECKEL, M. A.; AHRENS, T. Challenges in Sepsis Care. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 28, n. 4, p. 513–532, 2016.

SEOANE, S. et al. Administration of the optimized β -Lapachone-poloxamer-cyclodextrin ternary system induces apoptosis, DNA damage and reduces tumor growth in a human breast adenocarcinoma xenograft mouse model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 497–504, 2013.

SHUKLA, P. et al. Therapeutic interventions in sepsis: Current and anticipated pharmacological agents. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 22, p. 5011–5031, 2014.

SHUKLA, S.; BAJPAI, V. K.; KIM, M. Plants as potential sources of natural immunomodulators. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 17–33, 2014.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F. .; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801–810, fev. 2016.

SINGH, S.; EVANS, T. W. Organ dysfunction during sepsis. **Applied Physiology in Intensive Care Medicine 1: Physiological Notes - Technical Notes - Seminal Studies in Intensive Care, Third Edition**, p. 331–342, 2012.

SITÔNIO, M. M. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2- β]pyran-5,6-dione (β -lapachone). **Inflammation Research**, v. 62, n. 1, p. 107–113, 2013.

SNOWDEN, C.; KIRKMAN, E. The pathophysiology of sepsis. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 2, n. 1, p. 11–14, 2002.

STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The pathogenesis of sepsis. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 19–48, 2011.

SUBRAMANIAN, P. et al. Regulation of tissue infiltration by neutrophils: Role of integrin $\alpha 3\beta 1$ and other factors. **Curr Opin Hematol.**, v. 23, n. 1, p. 36–43, 2017.

SUGIMOTO, M. et al. Resolution of inflammation : what Controls its Onset ? **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. April, 2016.

SUO, M. et al. Bioactive phenylpropanoid glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7336–7345, 2013.

SUO, M.-R.; YAN, S.-Y. Iridoid Glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 12, p. 1611–1616, 2016.

TABAH, A. et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: The EUROBACT International Cohort Study. **Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1930–1945, 2012.

TANIGUCHI, L. U. et al. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.

TITHERADGE, M. Nitric oxide in septic shock. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1411, p. 437–455, 1999.

TURNIDGE, J. Impact of Antibiotic Resistance on the Treatment of Sepsis. n. Mic, p. 677–682, 2003.

TZENG, H. P. et al. ??-Lapachone Reduces Endotoxin-Induced Macrophage Activation and Lung Edema and Mortality. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, n. 1, p. 85–91, 2003.

VERNON, P. J.; TANG, D. Eat-Me: Autophagy, Phagocytosis, and Reactive Oxygen Species Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 677–691, 2013.

VÍCTOR, V. M. et al. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis: A

Potential Therapy with Mitochondria-Targeted Antioxidants. p. 376–389, 2009.

WALLEY, K. R. et al. Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3847–3851, 1997.

WANG, N. et al. Ulinastatin is a novel candidate drug for sepsis and secondary acute lung injury, evidence from an optimized CLP rat model. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 799–807, 2013.

WIERSINGA, W. J. et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 36–44, 2014.

WEISS, S. L.; DEUTSCHMAN, C. S. Elevated malondialdehyde levels in sepsis - something to "stress" about? 2014.

WU, Y. et al. -Lapachone Induces NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1- and Oxidative Stress-Dependent Heat Shock Protein 90 Cleavage and Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 357, n. 3, p. 466–475, 2016.

XU, J. et al. β -LAPACHONE AMELIORIZATION OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS. v. 254, n. 501, p. 46–54, 2014.

YADAV, H.; CARTIN-CEBA, R. Balance between Hyperinflammation and Immunosuppression in Sepsis. p. 42–50, 2016.

YAMASHITA, M. et al. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 6286–6291, 2009.

YUKI, K.; MURAKAMI, N. Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 15, n. 1, p. 57–69, 2015.

ZANG, L. et al. Autophagy enhanced phagocytosis of apoptotic cells by oridonin-treated human histocytic lymphoma U937 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 518, n. 1, p. 31–41, 2012.

ANEXO



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA B-LAPACHONA EM MODELO DE SEPSIS E IN VITRO", protocolado sob o CEUA nº 1912080716, sob a responsabilidade de **Marta Chagas Monteiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 28/07/2016.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF THE B-LAPACHONA IN SEPSIS MODEL AND IN VITRO", utilizing 60 Isogenics mice (60 males), protocol number CEUA 1912080716, under the responsibility of **Marta Chagas Monteiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with

Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 07/28/2016.

Vigência da Proposta: de 08/2016 a 03/2018

Área: Pos-graduação Em Neurociencias

Procedência: Biotério Central ICB/UFPA

Espécie: Camundongos isogênicos

Linhagem: Swiis

Gênero: Machos

idade: 30 a 90 dias

N: 60

Peso: 20 a 30 g

Resumo: A sepse é caracterizada pela complicação de um processo infeccioso resultando em uma inflamação sistêmica com ampla lesão tecidual. A falta de tratamentos específicos colabora para que esta síndrome seja uma das principais causas de morte em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (MARTINS et al., 2003). A resposta inute contra patógenos, como bactérias, é aumentada na sepse e SRIS com elevada produção de citocinas pró-inflamatórias além de um desequilíbrio no sistema redox, aspectos esses amplamente estudados na fisiopatologia da sepse (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011). Dessa forma, existe a necessidade de se encontrar novas terapias provenientes de produtos naturais com que levem a homeostase do organismo. Estudos relatam que o uso de compostos anti-inflamatórios com propriedades imunomoduladoras podem auxiliar no tratamento da sepse. A ação de B-lapachona sobre a inibição de NO, PGE2 e citocinas pro-inflamatórias como IL-1 beta, IL-6e TNF-alfa foi demonstrada. (DONG-HO et al., 2007; Lee et al., 2005, JIHONG et al, 2013; SITÔNIO et al., 2012). A atividade anti-inflamatória de B-lapachona com redução de mediadores inflamatórios está relacionada com inibição de NF-Kb (TZENG et al., 2003). Além disso, a atividade antimicrobiana de B-lapachona já foi descrita anteriormente. Compostos terapêuticos que modulam a resposta inflamatória são de considerável interesse, pois podem auxiliar no tratamento de pacientes com sepse. In vivo será utilizado o modelo de sepse murino denominado de transfixação do cotocecal, onde após o tempo de tratamento os animais serão sacrificados de acordo com a normas internacionais para pesquisa e experimentação em animal, com autorização prévia do

Comitê de Ética Em Pesquisas Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE/UFPA).

Belém do Pará, 27 de setembro de 2016

Prof. Dr. Moisés Hamoy

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Rua Augusto Correa, S/N - Bairro do Guamá, CEP:66075-110, Inst. de Ciênc. Biol., térreo, Belém-Pará - tel: 55 (91)
3201-8064 / fax: -

Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 14h às 18h : e-mail: ceua@ufpa.br

CEUA Nº 1912080716