



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR**

KELY CAMPOS NAVEGANTES LIMA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO LIPÍDICA EXTRAÍDA DE *Agaricus
brasiliensis* ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA *in vitro* E EM MODELO DE
SEPSE LETAL EM MURINO.**

BELÉM

2021

KELY CAMPOS NAVEGANTES LIMA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO LIPÍDICA EXTRAÍDA DE *Agaricus brasiliensis*
ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA *in vitro* E EM MODELO DE SEPSE LETAL
EM MURINO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPGNBC), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA), como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área: Biologia Celular.

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

BELÉM

2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

L732a Lima, Kely Campos Navegantes.
Avaliação do efeito da fração lipídica extraída de *Agaricus
brasiliensis* antioxidante e imunomoduladora in vitro e em modelo
de sepse letal em murino / Kely Campos Navegantes Lima. — 2021.
88 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2021.

1. Sepse. 2. *Aquarius brasiliensis*. 3. Disfunção orgânica.
4. Antioxidante. 5. Imunomodulador. I. Título.

CDD 571.6

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO LIPÍDICA EXTRAÍDA DE *Agaricus brasiliensis* ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA *in vitro* E EM MODELO DE SEPSE LETAL EM MURINO.

Por

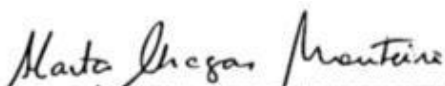
KELY CAMPOS NAVEGANTES LIMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PNBC), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (ICB-UFPA), como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

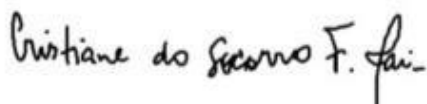
Orientadora: Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro.

Data de aprovação: Belém, 30 de dezembro de 2021.

Banca examinadora:



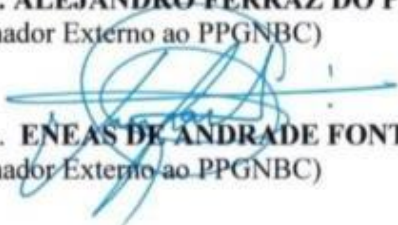
Profa. Dra. **MARTA CHAGAS MONTEIRO** (UFPA).
(Presidente da banca examinadora e orientadora, sem direito a voto)



Profa. Dra. **CRISTIANE DO SOCORRO FERRAZ MAIA** (UFPA).
(Examinadora Interna do PPGNBC).

Alejandro Ferraz
Do Prado:
81084641291

Prof. Dr. **ALEJANDRO FERRAZ DO PRADO** (UFPA).
(Examinador Externo ao PPGNBC)



Prof. Dr. **ENEAS DE ANDRADE FONTES JUNIOR** (UFPA).
(Examinador Externo ao PPGNBC)

Eneas de A. Fontes Jr.
SIAPE 2354819
UFPA

Ao meu esposo Bruno pelo amor e apoio incondicional e minha filha Kyara por ser um anjo em minha vida;

À minha família, em especial minhas tias Ana e Rosa por ter me dado o suporte para chegar aonde cheguei;

À minha orientadora pela oportunidade de mostrar que eu sou capaz e pelo aprendizado;

Aos meus amigos/irmãos do laboratório Ana, Josi, Juliana, Letícia, Lucas, Sávio pois sem eles esse trabalho não seria possível.

*“...Just because it burns doesn't mean you're gonna die
You've gotta get up and try...”
(Pink- Try)*

RESUMO

A sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada do hospedeiro à uma infecção. Durante a sepse ocorre a desregulação da resposta do hospedeiro com a liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios, geração de espécies reativas com depleção das defesas antioxidantes e dano celular. Com isso o paciente desenvolve disfunção orgânica. Nesse contexto, nosso grupo propõe que a Fração lipídica de *A. brasiliensis* (FLAb) como uma possível terapia da sepse considerando sua atividade imunomoduladora e antioxidante sistêmica do em modelo de sepse murino. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da FLAb isolada *in vitro* e avaliar o efeito do tratamento com FLAb isolada ou associada ao antibiótico ertapenem (F-ERTA) nos parâmetros da coagulação, antioxidante e imunomodulador no modelo de sepse letal em murino. Para isso, a FLAb foi fornecido gentilmente pela Dr. Herta Dalla-Santa da UNICENTRO. No presente estudo foi avaliado a capacidade antioxidante de diferentes concentrações de FLAb (1,25 e 5 µg/mL) e em linhagem de macrófagos RAW 264.7-Luc foi avaliado a citotoxicidade, capacidade fagocítica, óxido nítrico, atividade da NF-κB e citocinas TNF-α e IL-6. Em modelo de sepse CLP em *Mus musculus* de linhagem swiss foi avaliado a sobrevivência por 7 dias dos grupos CLP+Sal (0,9%), CLP+FLAb (0,2mg/Kg), CLP+F-erta (0,2mg/Kg; 30mg/Kg). Para avaliação dos parâmetros na coagulação, antioxidante e imunomodulador, os camundongos foram tratados por 6 ou 24h após CLP. *In vitro*, a FLAb mostrou atividade antioxidante e anti-inflamatória em ambas concentrações. *In vivo*, os animais CLP+Sal vieram a óbito dentro de no máximo 48 horas enquanto os grupos tratados com FLAb e F-Erta sobreviveram os 7 dias. Durante esse período foi avaliados parâmetros clínicos destes animais, os animais sépticos tratados com salina apresentaram piloereção, com nível de consciência pouco ativo e na maior parte do tempo apresentaram-se parados na gaiola, alguns destes apresentaram secreção ocular. Além disso, os animais tratados com salina apresentaram perda de peso significativa, redução no consumo de água e ração resultando no óbito. Os grupos FLAb e F-ERTA apresentaram-se ativos, com a aparência normal, com respiração e batimentos cardíacos normais além de consumirem água e ração dentro do normal. No sítio inflamatório, cavidade peritoneal o tratamento com a FLAb apresentou efeito anti-inflamatório, diminuiu as espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumentou a atividade antioxidante GSH e protegeu do dano celular, mantendo o recrutamento de neutrófilos e os níveis de óxido nítrico (NO), reduzindo a carga bacteriana. Nos parâmetros da coagulação (plaquetograma, tp e ttpa), o tratamento com a FLAb e F-Erta eliminou a carga bacteriana protegeu os animais do dano

tecidual. No fígado, 6 horas após CLP o tratamento com a FLAb e F-ERTA foi observado nos parâmetros bioquímicos efeito protetor, além disso, apresentou atividade imunomoduladora, antimicrobiana e antioxidante evitando o dano hepático. Nos parâmetros avaliados no coração, o tratamento com a FLAb e F-ERTA após CLP protegeu os animais do dano cardíaco através da atividade imunomoduladora, antimicrobiana e antioxidante. Nesse sentido, a FLAb isolada mostrou ser promissora como tratamento e/ou coadjuvante na sepse além de evitar a disfunção orgânica dos animais sépticos.

Palavras-chave: Sepses, *Agaricus brasiliensis*, disfunção orgânica, antioxidante e imunomodulador.

ABSTRACT

Sepsis is defined as a potentially fatal organ dysfunction caused by a dysregulated host immune response to an infection. During sepsis, dysregulation of the host response occurs with the excessive release of pro-inflammatory mediators, generation of reactive species with depletion of antioxidant defenses and cellular damage. As a result, the patient develops organ dysfunction. In this context, our group proposes the *A. brasiliensis* Lipid Fraction (FLAb) as a possible therapy for sepsis considering its immunomodulatory and systemic antioxidant activity in a murine sepsis model. Thus, the present study aimed to evaluate the activity of FLAb isolated *in vitro* and to evaluate the effect of treatment with FLAb alone or associated with the antibiotic ertapenem (F-Erta) on coagulation, antioxidant and immunomodulatory parameters in the lethal sepsis model in murine. For this, FLAb was kindly provided by Dr. Herta Dalla-Santa from UNICENTRO. In the present study, the antioxidant capacity of different concentrations of FLAb (1.25 and 5 $\mu\text{g/mL}$) was evaluated and in a RAW 264.7-Luc macrophage cell line, cytotoxicity, phagocytic capacity, nitric oxide, NF- κ B activity and cytokines TNF- α and IL-6 were evaluated. The survival rates were analyzed 7 days in a model of CLP sepsis in swiss albino mice (*Mus musculus*), and treated with CLP+Salt (0.9%), CLP+FLAb (0.2mg/Kg), CLP+F-erta (0.2mg) /Kg; 30mg/Kg). For evaluation of on coagulation, antioxidant and immunomodulatory parameters, the mice were treated by 6 and/or 24h after CLP. *In vitro*, FLAb show antioxidant and anti-inflammatory activity in both concentrations. *In vivo*, all CLP+Salt animals died within a maximum of 48 hours while the FLAb and F-Erta treated groups survived the 7 days. During this period, clinical parameters of these animals were evaluated, the septic animals treated with saline showed piloerection, with little active level of consciousness and most of the time they were stopped in the cage, some of them had ocular secretion. In addition, animals treated with saline showed significant weight loss, reduced water and feed consumption resulting in death. The FLAb and F-Erta groups were active, with normal appearance, with normal breathing and heart rate, in addition to consuming water and food within normal limits. In the inflammatory site, peritoneal cavity, the treatment with FLAb showed an anti-inflammatory effect, decreased reactive oxygen species (ROS) and increased GSH antioxidant activity and protected from cell damage, maintaining neutrophil recruitment and nitric oxide levels (NO), reducing the bacterial load. Regarding coagulation parameters (platelet count, tp and tpa), treatment with FLAb and F-Erta eliminated the bacterial load and protected the animals from tissue damage. In the liver, 6 hours after CLP the treatment

with FLAb and F-ERTA was observed in the biochemical parameters protective effect, in addition, it presented immunomodulatory, antimicrobial and antioxidant activity preventing liver damage. In the parameters evaluated in the heart, the treatment with FLAb and F-ERTA after CLP protected the animals from cardiac damage through immunomodulatory, antimicrobial and antioxidant activity. In this sense, FLAb alone showed promise as a treatment and/or adjunct in sepsis, in addition to preventing organic dysfunction in septic animals.

Keywords: Sepsis, *Agaricus brasiliensis*, organic dysfunction, antioxidant and immunomodulator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Papel das células endoteliais.	21
Figura 02:	Ativação das células endoteliais na sepse.	23
Figura 03:	Ativação da cascata da coagulação na sepse.	24
Figura 04:	Formação de imunotrombos.	25
Figura 05:	Desenvolvimento da disfunção microvascular.	26
Figura 06:	Desenvolvimento da disfunção hepática.	28
Figura 07:	Desenvolvimento da disfunção cardíaca.	29
Figura 08:	Algoritmo de gerenciamento da gestão hemodinâmica individualizada.	30
Figura 09:	O cogumelo <i>Agaricus brasiliensis</i> e a estrutura química do ergosterol.	32
Figura 10:	Atividade biológicas de <i>A.brasiliensis</i> .	34
Figura 11:	Delineamento experimental <i>in vitro</i> da FLAb em diferentes concentrações (1,25 e 5 µg/mL).	39
Figura 12:	Equação da reação de Griess.	41
Figura 13:	Delineamento experimental para avaliação do efeito da FLAb na sobrevida e parâmetros clínicos em modelo de sepse em murinos.	44
Figura 14:	Delineamento experimental para avaliação do efeito da FLAb na disfunção orgânica em modelo de sepse em murinos.	46
Figura 15:	Procedimento da indução da sepse letal por CLP.	47
Figura 16:	Avaliação da atividade da FLAb <i>in vitro</i> .	53
Figura 17:	Avaliação da atividade fagocítica e anti-inflamatória da FLAb <i>in vitro</i> .	54
Figura 18:	Efeito da FLAb como terapia isolada ou adjuvante na taxa de sobrevida (%) e nos parâmetros fisiológicos dos animais sépticos.	56
Figura 19:	Efeito da FLAb na cavidade peritoneal em modelo de sepse letal.	58
Figura 20:	Resumo do efeito da FLAb na cavidade peritoneal em modelo de sepse letal.	59
Figura 21:	Efeito da FLAb nos parâmetros da coagulação e do estresse oxidativo no modelo de sepse letal.	61
Figura 22:	Resumo do efeito da FLAb nos parâmetros da coagulação e no estresse oxidativo.	62
Figura 23:	Efeito da FLAb nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no fígado.	63

Figura 24:	Resumo do efeito da FLAb nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no fígado.	64
Figura 25:	Efeito da FLAb de flab isolada ou concomitante com ertapenem nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no coração.	65
Figura 26:	Resumo do efeito da FLAb de flab isolada ou concomitante com ertapenem nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no coração.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 01:	Classificação Taxonômica de <i>Agaricus brasiliensis</i> .	31
Quadro 02:	Escore de sepse em murinos	44
Quadro 03:	Relação de analitos, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda (reagentes Labtest).	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Escore do SOFA relacionado a Sepse.	20
Tabela 02:	Parâmetros hematológicos dos grupos sham, salina, Ertapenem (30mg/kg), fração lipídica de <i>A. brasiliensis</i> (5µg/mL) e fração lipídica de <i>A. brasiliensis</i> + Ertapenem 24 horas após sepse induzida.	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise Variância
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
AT	Antitrombina
CEPAE- UFPA	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK-MB	Isoenzima MB da Creatina Quinase
CLP	<i>Cecal Ligation Puncture Procedure</i> - Ligação e perfuração do ceco
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCF	Diclorodidrofluoreceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
eNOS	Óxido Nítrico Endotelial
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERON	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERTA	Ertapenem
ET	Endotelina
FA	Fosfatase Alcalina
FLAb	Fração Lipídica de <i>A.brasiliensis</i>
FT	Fator Tecidual
GSH	Glutationa Reduzida
H ₂ DCFH-DA	2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média

IKK	Quinase IκB
IL	Interleucina
ILAS	Instituto Latino Americano de Sepsis
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fostato de Potássio Dihidrogenado
LPB	Micélio de <i>A. brasiliensis</i>
MDA	Malonaldeído
MODS	Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos
MPO	Mieloperoxidase
MSS	<i>Murine Sepsis Score</i>
MyD88	Fator 88 de Diferenciação Mielóides
Na ₂ HPO ₄	Fostato de Sódio Dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NED	Cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
NO ₂	Nitrito
O ₂	Oxigênio
O ₂ [•]	Ânion superóxido
PAF	Fator Ativador Plaquetário
PAI-1	Inibidor do Ativador de Plasminogênio
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PC	Proteína C
PCR	Proteína C Reativa
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PS	Proteína S
qSOFA	quick SOFA
RDW	Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos
SOD	Superóxido Dismutase
SOFA	Avaliação Sequencial de Falha de Órgão

TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TMB	3,3',5,5'Tetrametilbenzidina
TNB	5-tio- 2-nitrobenzóico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TP	Tempo de Protrombina
tPA	Ativador de Plasminogênio
TRL	Receptores <i>Toll-like</i>
TTPa	Tromboplastina Parcial Ativada
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-Oeste
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2.REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE	20
2.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE E O DESENVOLVIMENTO DA DISFUNÇÃO ORGÂNICA	21
2.2.1 Desenvolvimento da disfunção vascular endotelial na sepse	21
2.2.2 Desenvolvimento da disfunção hepática na sepse.....	26
2.2.3 Desenvolvimento da disfunção cardíaca na sepse.....	28
2.3 TERAPIA NA SÍNDROME DA DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS	29
2.4 <i>Agaricus brasiliensis</i> – COGUMELO DO SOL.....	31
2.4.1 Classificação taxonômica da espécie e composição química.....	31
2.4.2 Propriedades farmacológicas do <i>A.brasiliensis</i>	32
3.OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.2.1 Avaliação da atividade <i>in vitro</i>	36
3.2.2 Avaliação do efeito do tratamento FLAb e F-ERTA na disfunção microvascular, hepática e cardíaca em modelo de sepse letal em murino	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 REAGENTES	38
4.2 FORNECIMENTO E PREPARO DA FLAb	38
4.3.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre (DPPH)	39
4.3.2 Citotoxicidade pelo método direto 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT)	40
4.3.3 Avaliação da capacidade fagocítica	40
4.3.4 Ensaio de luciferase em linhagem RAW 264.7 – Luc	41
4.3.5 Dosagem de nitritos.....	41
4.3.6 Dosagem de citocinas.....	42
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO FLAB E F-ERTA <i>in vivo</i>	42
4.4.1 Comitê de ética.....	42
4.4.2 Obtenção dos animais e eutanásia.....	42
4.4.3 Sobrevida e parâmetros clínicos	43
4.4.4 Grupos experimentais e esquema de tratamento para avaliação dos parâmetros da coagulação, estresse oxidativo e imunomodulador	45
4.4.5 Modelo de sepse letal induzida por CLP	46

4.4.6 Obtenção de amostras	47
4.4.7 Avaliação da carga bacteriana.....	48
4.4.8 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo	48
4.4.5 Avaliação dos parâmetros da coagulação.....	50
4.4.6 Determinação da isoenzima MB da Creatina Quinase (CK-MB)	51
4.4.7 Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO).....	51
4.4.8 Dosagem de citocinas.....	51
4.4.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos	51
4.4.10 Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS	53
5.1 ATIVIDADE DA FLAb <i>in vitro</i>	53
5.1.1 Atividade anti-inflamatória e antioxidante da flab.....	53
5.2 ATIVIDADE DA FLAb em modelo de sepse murino letal	54
5.2.1 O tratamento com FLAb aumenta a sobrevivência, reduz carga bacteriana e melhora parâmetros clínicos dos animais sépticos	54
5.2.2 O efeito do tratamento de flab isolado ou concomitante com ertapenem na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP.	56
5.2.3 O efeito do tratamento de flab isolada ou concomitante com ertapenem na prevenção da disfunção na coagulação	59
5.2.4 Avaliação do efeito do tratamento de flab isolada ou concomitante com ertapenem na disfunção dos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no fígado.	62
5.2.5 Avaliação do efeito do tratamento de flab isolada ou concomitante com ertapenem nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no coração.....	64
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIA.....	76
ANEXOS	88
ANEXO 1 – Certificado do comitê de ética	88

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada do hospedeiro à uma infecção (SEYMOUR et al., 2016). É caracterizada clinicamente como a suspeita ou a documentação de uma infecção associado a 2 pontos ou mais no escore da avaliação sequencial de falência orgânica - “*Sequential Organ Failure Assesment*” (SOFA) e para pacientes internado em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) o mínimo de 2 pontos no SOFA. A sepse é considerada como a maior causa de internação em UTI adulto e infantil e com taxa de mortalidade cerca de 55,7% (RUDD et al., 2020).

A patogênese da sepse consiste na desregulação sistêmica da resposta do hospedeiro com a liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 1 (IL-1), dano mitocondrial, excesso da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONS) com depleção das defesas antioxidantes, coagulopatia, disfunção neuroendócrina, entre outros processos fisiopatológicos (HUANG; CAI; SU, 2019). A desregulação da resposta do indivíduo associada a fatores como sítio da infecção, severidade, bem como a demora no diagnóstico e tratamento do paciente pode evoluir para a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS). A MODS é definida como uma síndrome clínica caracterizada pelo desenvolvimento de disfunção fisiológica progressiva e potencialmente reversível em dois ou mais órgão ou sistema de órgão (ZIESMANN; MARSHALL, 2018).

De acordo com (JOFFRE et al., 2020), a disfunção nas células endoteliais é considerada um fator chave no desenvolvimento da disfunção microvascular e na progressão da MODS. A disfunção microvascular é definida como qualquer dano nos componentes celulares microvascular, incluindo células endoteliais, músculo liso, células sanguíneas circulantes, que tem como consequência estagnação do fluxo sanguíneo, lesão de células parenquimatosas com a disfunção mitocondrial e coagulopatia (INCE; DE BACKER; MAYEUX, 2020). Outra disfunção importante é a disfunção hepática, pois está presente em cerca de 39,9% dos pacientes sépticos e a mortalidade é de 68% comparado com as demais. Como consequência, observa-se um nível de bilirrubina total superior a 2mg/dL, nível de fosfatase alcalina (FA) ou concentração sérica de alanina transaminase (ALT) duas vezes superior valor normal e o tempo de protrombina (TP) 1,5 vezes superior ao controle e é considerado um forte preditor de mortalidade (WOŻNICA et al., 2018; ZIESMANN; MARSHALL, 2018).

De acordo com (WEISS et al., 2020), o protocolo de manejo de pacientes com disfunção orgânica está relacionado ao reconhecimento da infecção, hemodinâmica, ventilação do

paciente bem como terapias endócrinas e metabólicas dentro das primeiras 48 horas. Além disso, faz-se necessário o uso de terapias adjuvantes como o uso de antioxidantes tais como selênio, vitamina C e N-acetilcisteína (MANTZARLIS; TSOLAKI; ZAKYNTHINOS, 2017; WEISS et al., 2020), imunossupressores ou imunoestimulantes tais como anti-PD-(L)1 ou anti-TNF- α , de acordo com a fase clínica de hiperinflamatória ou imunossupressão do paciente séptico (PETERS VAN TON et al., 2018). Além dos micronutrientes selênio e vitamina C, o uso de outros nutracêuticos com propriedades imunomoduladoras e antioxidantes tais como *Rhodiola rosea* L, *Agaricus brasiliensis* e mirecetina, tem-se mostrado promissor tanto em modelos experimentais como na clínica com a redução do estresse oxidativo, aumento da eficiência dos antimicrobianos, aumentando a imunidade do paciente e sua resposta no tratamento, reduzindo a morbidade (NAVEGANTES-LIMA et al., 2020a; PU et al., 2020; XU; QI; YAN, 2021)

Entre estes produtos, o *A. brasiliensis* é rico em metabólitos bioativos tais como lectina, fenólicos e polifenólicos, terpenóides, compostos orgânicos voláteis, polissacarídeos (KALÁČ, 2013), especialmente β -D-glucanos (MIZUNO; NISHITANI, 2014) e ergosterol (DE OLIVEIRA et al., 2018). O ergosterol assim como outros esteróis presente nos cogumelos possui atividade antioxidante *in vitro* através do sequestro de radicais DPPH e na presença de oxidantes como hidroperóxido de terc-butila (t-BOOH) na concentração de 4 ou 6 mM é capaz de impedir peroxidação dos fosfolipídios de leveduras *S.cerevisae* mantendo a integridade da membrana plasmática (DUPONT et al., 2021). (GAŞECKA et al., 2018) encontrou resultados semelhantes, em que 6,0 mg/100g de ergosterol extraído de *A. brasiliensis* apresentou excelente capacidade de sequestro de radicais de DPPH. Outra atividade conhecida do ergosterol extraído do gênero *Agaricus* é antimicrobiana, (CORRÊA et al., 2018) suplementaram iogurte com extrato rico em ergosterol de *A.brasiliensis* e avaliaram *in vitro* a atividade bacteriostática frente a oito bactérias gram positivas e gram negativas entre elas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* mais eficaz que o controle ampicilina e antifúngica frente à *Aspergillus versicolor*.

Nesse contexto, considerando o efeito imunomodulador, antimicrobiano e antioxidante sistêmico do *A.brasiliensis*, é de grande interesse avaliar o efeito da fração lipídica do cogumelo em animais com sepse induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP) na disfunção microvascular, cardíaca e hepática.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE

A sepse é uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada do hospedeiro à uma infecção (SEYMOUR et al., 2016). Atualmente é considerada a maior causa de mortalidade de crianças e adultos na UTI em que segundo o ILAS estima-se que cerca de 400 mil casos de sepse no Brasil por ano, e desses 240 mil vem a óbito (ILAS, 2017). Dados coletados de 1477 UTI no Brasil pela Associação de Medicina Intensiva Brasileira (2021), mostram que cerca de 32% das internações em UTI adulto são devido a infecção/sepse e na UTI pediátrica o percentual é de 44,96%. Ainda de acordo com (RUDD et al., 2020) cerca de 48,9 milhões de indivíduos vieram a óbito no período de 1990 a 2017, o que representa 20% de todas as mortes globais, com taxa de mortalidade maior nos países subdesenvolvidos.

Esta patologia pode ser desencadeada por vírus, bactéria, fungos ou protozoários, no entanto, estudos mostram que a principal causa é bacteriana ou fúngica. De acordo com o estudo realizado por Dolin et al. (2019), a incidência de infecções bacterianas por gram-negativas correspondeu a 62,2% dos casos e a gram-positivas a 46,8%, em relação a sepse fúngica aproximadamente 17% dos pacientes com sepse fúngica é devido a *Candida albicans*, seguida de *Aspergillus* (3%) (DOLIN et al., 2019). O diagnóstico da sepse é de acordo com critério clínico a presença de uma suspeita ou identificação de um agente etiológico associado a infecção, além disso o paciente deve apresentar sinais e sintomas que os incluam em 2 ou mais pontos do escore de SOFA (Tabela 01). Para pacientes internados em UTI, há necessidade de estar incluído no mínimo de 2 pontos no *quick* SOFA (qSOFA). O qSOFA corresponde a uma frequência respiratória maior ou igual a 22/min, alteração do estado mental e a pressão sistólica menor ou igual a 100mmHg (SEYMOUR et al., 2016; SINGER et al., 2016).

Tabela 01. Escore do SOFA relacionado a Sepse.

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)

Tabela 01. Escore do SOFA relacionado a Sepse.

(Conclusão)

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Cardiovascular	PAM \geq 70mmHg	PAM < 70mmHg	Dopamina <5; dobutamina	Dopamina 5-15; epinefrina <0,1; Norepinefrina <0,1	Dopamina 5-15; epinefrina \geq 0,1; Norepinefrina >0,1
Nervoso Central Escala de Glasgow (coma) ^a	15	13 – 14	10 - 12	6 – 9	<6
Renal					
Creatinina:mg/dL (umol/L)	< 1.2	1,2 - 1,9	2 - 3,4	3,5 - 4,9 (300-440)	>5 (440)
Débito Urinário (mL/d)	(110)	(110-170)	(171-299)	<500	<200

Abreviações: FiO2. Fração inspirada de oxigênio; PAM. Pressão Arterial Média; PaO2. Pressão parcial de oxigênio.
^a. O escore da Escala de Coma Glasgow é de 3-15, quanto mais alto melhor a função neurológica.

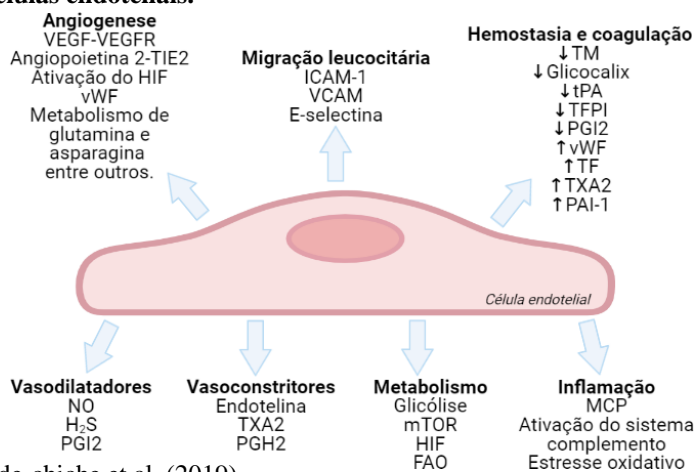
Fonte: adaptado de Singer et al. (2016)

2.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE E O DESENVOLVIMENTO DA DISFUNÇÃO ORGÂNICA

2.2.1 Desenvolvimento da disfunção vascular endotelial na sepse

O endotélio vascular é um tecido epitelial pavimentoso simples que reveste o interior dos vasos sanguíneos e linfáticos. As células endoteliais expressam diferentes tipos de antígenos de superfície e receptores, bem como podem gerar respostas diferentes de acordo com a localização e o microambiente em que se encontram (JOURDE-CHICHE et al., 2019). O endotélio atua como uma barreira seletiva para a saída de moléculas na circulação; no transporte de glicose principalmente através da GLUT-1; participa do transporte de aminoácidos como L-arginina; produção de NO; atua na filtração glomerular, angiogênese, hemostasia, coagulação entre outros como mostrado na Figura 1 (JOURDE-CHICHE et al., 2019).

Figura 01. Papel das células endoteliais.



Fonte: Adaptado de Joude-chiche et al. (2019).

As células endoteliais são consideradas células imunes vasculares não convencionais, durante o desenvolvimento da sepse células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos e outras)

e endoteliais são ativadas por patógenos através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Após o reconhecimento do PAMP por algum PRR como os receptores *Toll-like* (TRL), intracelularmente, a proteína fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) recruta cinases associadas ao receptor da IL-1 para ativar o fator 6 associado ao receptor do TNF. Esse ativa o fator de crescimento beta associado a cinase 1, que por sua vez, promove ativação do complexo IKK. Este complexo proteico promove a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta na ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), que se transloca para ao núcleo para induzir a expressão de mediadores pró-inflamatórios tais como TNF- α e IL-1 (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019)

A citocina TNF- α se liga ao receptor de TNF 1 (TNFR1) na célula endotelial e recruta a proteína de domínio associado a TNFR (TRADD) que por sua vez recruta o receptor de serina/teonina quinase e interagem com a proteína 1 (RIP1) e o ao fator associado ao TNFR 2 (TRAF2). Este complexo chamado de sinalossoma ativa as vias NF- κ B/Rel e MAPK. Enquanto, a IL-1 se liga ao receptor IL-1R1 e induz a ativação da via de sinalização mediada pela resposta primária MyD88, receptor Toll/IL-1 contendo proteína adaptadora (TIRAP), IL-1R-associada a kinase (IRAK1), IRAK4, e TRAF6 a qual ativa também NF- κ B e proteína ativadora (AP-1) (SHI; SUN, 2018)

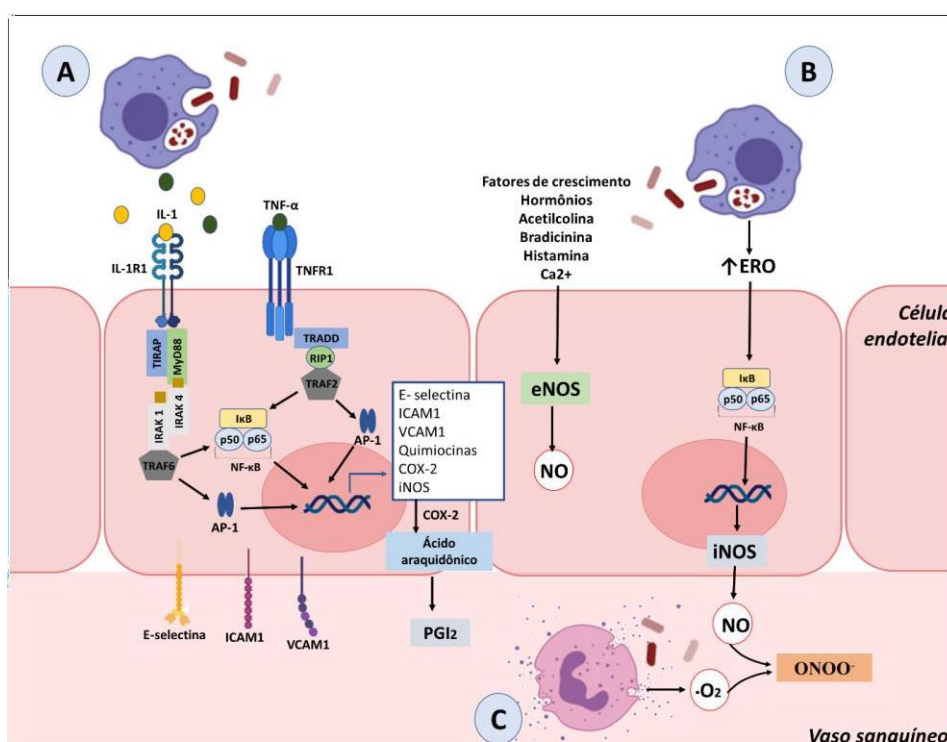
A ativação do fator de transcrição NF- κ B na célula endotelial irá liberar citocinas TNF- α e IL-1, aumentar a expressão das moléculas de adesão ICAM, VCAM e selectinas, além de liberar quimiocinas como MCP-1 e IL-6. Outro fator importante na ativação endotelial é o aumento da produção de NO. O NO tem um importante papel na defesa do sistema imune, na agregação plaquetária, no fluxo sanguíneo, transmissão sináptica, porém também está envolvido na citotoxicidade e em doenças do sistema cardiovascular. Esta molécula é gerado a partir da L-arginina via enzima oxido nítrico sintase (NOS), a qual pode gerar três isoenzimas: neuronal NOS (nNOS), indutase NOS (iNOS) e a endotelial NOS (eNOS) (PAPI; AHMADIZAR; HASANVAND, 2019; YANG et al., 2018).

Em condições fisiológicas, a célula endotelial mantém a atividade da eNOS, a qual é ativada por fatores de crescimento, hormônios, acetilcolina entre outros, a fim de manter a homeostase. No entanto, na sepse, a isoenzima iNOS é ativada devido ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β pelo sistema imune (TAKATANI et al., 2018). O aumento da produção de NO e de ERO como o superóxido (O $_2^{\bullet}$) produzido pelo *burst* oxidativo dos leucócitos, reage formando peroxinitrito (ONOO $^-$). O ONOO $^-$ assim como qualquer radical, por sua vez irá oxidar o cofator (*6R*-)5,6,7,8-*tetrahydrobiopterin* (BH4)

também conhecida como sapropterina, responsável pela síntese de óxido nítrico. Níveis reduzidos do cofator BH4 irá aumentar a geração de $O_2\bullet$ por eNOS, devido ao desacoplamento da eNOS nos vasos, desta forma a NOS se torna uma enzima geradora de radicais durante o processo inflamatório levando ao estresse oxidativo (DAIBER et al., 2020).

A figura 02 mostra o resumo do processo da ativação das células endoteliais na sepse.

Figura 02. Ativação das células endoteliais na sepse. (A) leucócitos ativados liberam citocinas IL-1 e TNF- α dá início a várias cascatas de quinase que levam a ativação dos fatores de transcrição fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína ativadora (AP-1) aumentando a expressão de selectinas, moléculas de adesão, gerando quimiocinas, COX-2 e NO (B) Leucócitos ativados produzem ERO e citocinas pro-inflamatórias que irão ativar as células endoteliais e estas aumentam a produção de NO por iNOS (C) No vaso sanguíneo neutrófilos ativados produzem ERO como o superóxido que reage com o NO formando ONOO- o qual tem efeito deletério no sistema endotelial.



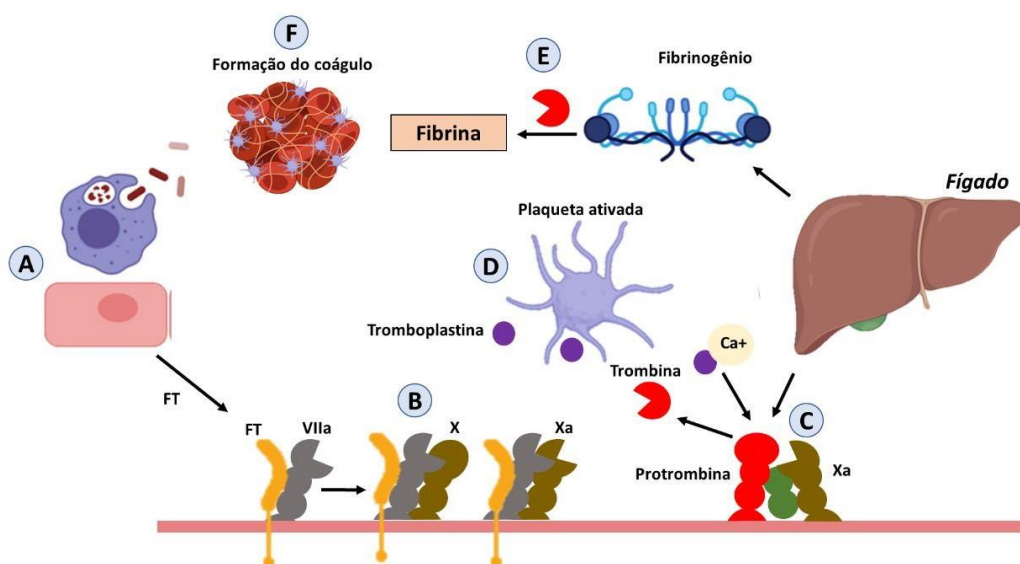
Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Endotoxinas locais e circulantes levam a ativação das células do sistema imune e endotelial o que induz a expressão do fator tecidual (FT), uma proteína de transmembrana que inicia a cascata de coagulação pela via extrínseca. O FT se liga ao fator VII, ativando-o e o complexo fator VII ativado/FT (VIIa/FT), responsável pela ativação do fator X em Xa. O fator Xa converte pequenas quantidades de protrombina (Fator II) em trombina, o que por sua vez resulta na clivagem do fibrinogênio produzido pelo fígado, em polímeros de fibrina, originando uma rede estável no trombo (COHEN; TURNER; MOAKE, 2020).

As células endoteliais lesionadas durante a sepse liberam mediadores solúveis tais como difosfato de adenosina (ADP) e tromboxano (TXA) que ativam as plaquetas. As plaquetas

ativadas também irão produzir tromboplastina que juntamente com o Ca^{2+} irá clivar protrombina em trombina amplificando a coagulação (COHEN; TURNER; MOAKE, 2020). A trombina por sua vez irá clivar o fibrinogênio e irá aumentar a secreção a citocina IL-1 α p18 por plaquetas, levando ao aumento da trombopoiese através da fração plaquetária imatura (FPI) ou também chamadas de plaquetas reticuladas e megacariócitos na medula óssea a fim de repor rapidamente o consumo das plaquetas durante o processo inflamatório (BURZYNSKI et al., 2019) (Figura 03).

Figura 03. Ativação da cascata da coagulação na sepse. (A) leucócitos ativados e células endoteliais expressam FT (B) O FT se liga ao fator VII (VIIa/FT) e ativa o fator Xa (C) O fator Xa converte protrombina em trombina (D) plaquetas juntamente com o Ca^{2+} irá clivar protrombina em trombina amplificando a coagulação (E) A trombina irá clivar o fibrinogênio produzido pelo fígado, em polímeros de fibrina (F) A rede de fibrina faz parte da formação do coágulo.

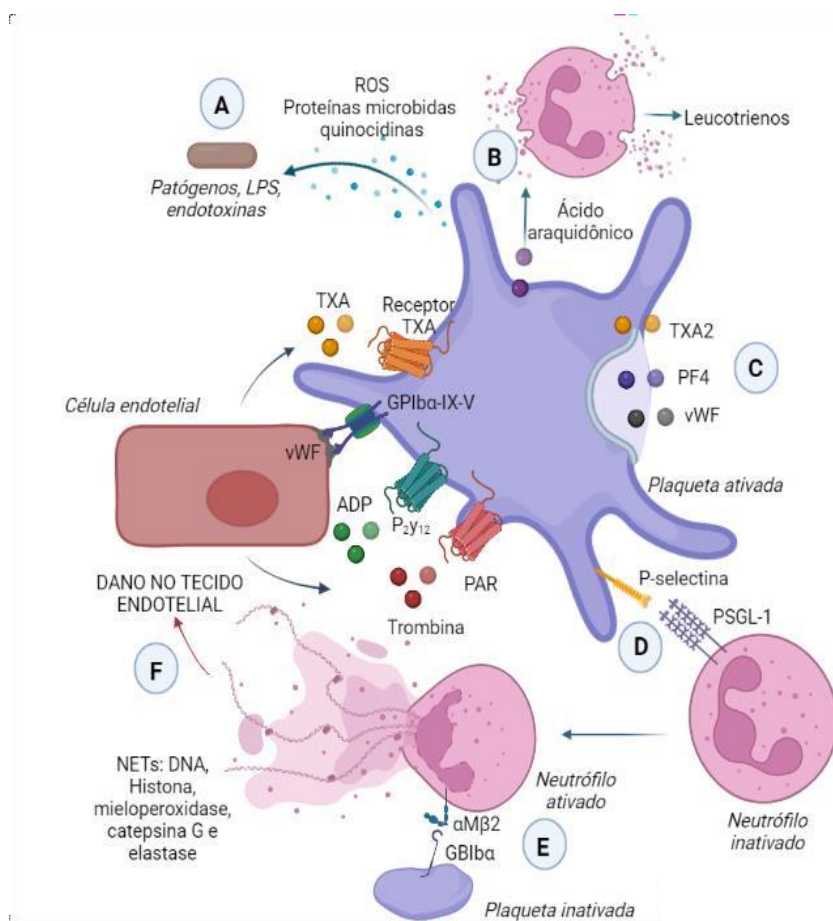


Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

As plaquetas são pequenos fragmentos de células anucleadas circulantes (megacariócitos). Na presença de patógenos (Figura 04-A) e de ADP as plaquetas são ativadas e desgranulam liberando moléculas antimicrobianas como ROS, proteínas microbidas e quinocidinas. Além disso, as plaquetas liberam quimiotáticos de linfócito B (CD40 e CD154), fatores do complemento C8 e C9, que irão formar o complexo de ataque à membrana, ácido araquidônico que induz os neutrófilos a produzirem leucotrienos (Figura 04-B), fator de plaquetas (PF4) para atrair monócitos, vWF e TXA-2 (Figura 04-C), e (KERRIS et al., 2020). Uma vez ativadas, as plaquetas expressam selectina-P que se liga a glicoproteína ligante-1 de P-selectina (PSGL-1) dos neutrófilos inativados (Figura 04-D) ativando-os. Os neutrófilos ativados expressam a integrina $\alpha\text{M}\beta 2$ que se liga glicoproteína Iba (GPIba) nas plaquetas

inativadas (Figura 04-E). Além disso, os neutrófilos ativados formam redes extracelulares de neutrófilos (NETs) que são compostas de proteínas nucleares como isoformas de histonas, proteínas granulares tais como serina proteases, elastase e catepsina G, com objetivo de destruir os patógenos, no entanto, as NETs podem levar ao dano no tecido endotelial. As células endoteliais lesionadas expõem vWF que promove ativação plaquetária. O ciclo de ativação célula endotelial-plaquetas-neutrófilos aceleram o processo de trombose promovendo o desenvolvimento da coagulação intravascular disseminada (Figura 04-F). (WANG et al., 2018).

Figura 04. Formação de imunotrombos. (A) Patógenos e endotoxinas induz desgranulação das plaquetas (B) Plaquetas ativadas produzem ácido araquidônico que induz os neutrófilos a secretarem leucotrienos. (C) Plaquetas ativadas produzem TXA-2, PF-4 e vWF. (D) Plaquetas ativadas expressam p-selectina que se ligam a PSGL-1 de neutrófilos inativados, ativando-os. (E) Neutrófilos ativados expressam a interina $\alpha M\beta 2$ que se ligam a $GBI\beta\alpha$ de plaquetas inativadas, ativando-as. (F) Neutrófilos ativados formam NETs que podem causar dano no tecido endotelial. Células endoteliais lesionadas expõem vWF que promove ativação plaquetária.

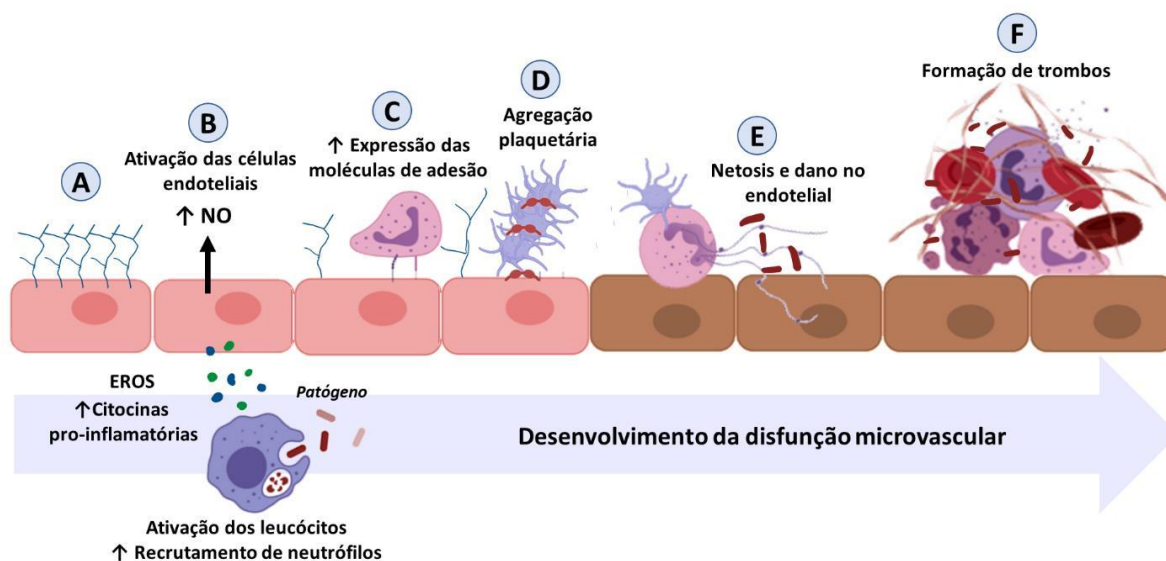


Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

A figura 05 mostra resumidamente como ocorre o desenvolvimento da disfunção microvascular a partir da célula endotelial intacta e o reconhecimento de patógenos até a formação de imunotrombos.

Figura 05. Desenvolvimento da disfunção microvascular. (A) Célula endotelial com o glicocálix intacto (B) O reconhecimento de patógenos por leucócitos leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e ERO que por sua vez irá ativar células endoteliais (C) A ativação das células endoteliais resulta no aumento da expressão

de moléculas de adesão para a transmigração leucocitária (D) A lesão endotelial aumenta a interação com as plaquetas ativadas por meio do fator de willebrand o que leva a agregação plaquetária (E) O aumento da carga bacteriana associada a ativação leucocitária resulta em netosis que leva ao dano endotelial (E) A disfunção microvascular resulta na formação de imunotrombos.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

2.2.2 Desenvolvimento da disfunção hepática na sepse

Um dos principais órgãos responsáveis pela síntese das proteínas de fase aguda e de coagulação é o fígado, que é responsável por diversas funções, tais como biotransformação, síntese de proteínas séricas, metabolismo de aminoácidos, lipídeos e carboidratos, equilíbrio hormonal, desintoxicação e regulação do sistema imune. Nesse sentido, o fígado apresenta papel chave durante o processo séptico, com eliminação do patógeno, inativação dos produtos bacterianos e produção de mediadores inflamatórios (KALRA et al. 2021).

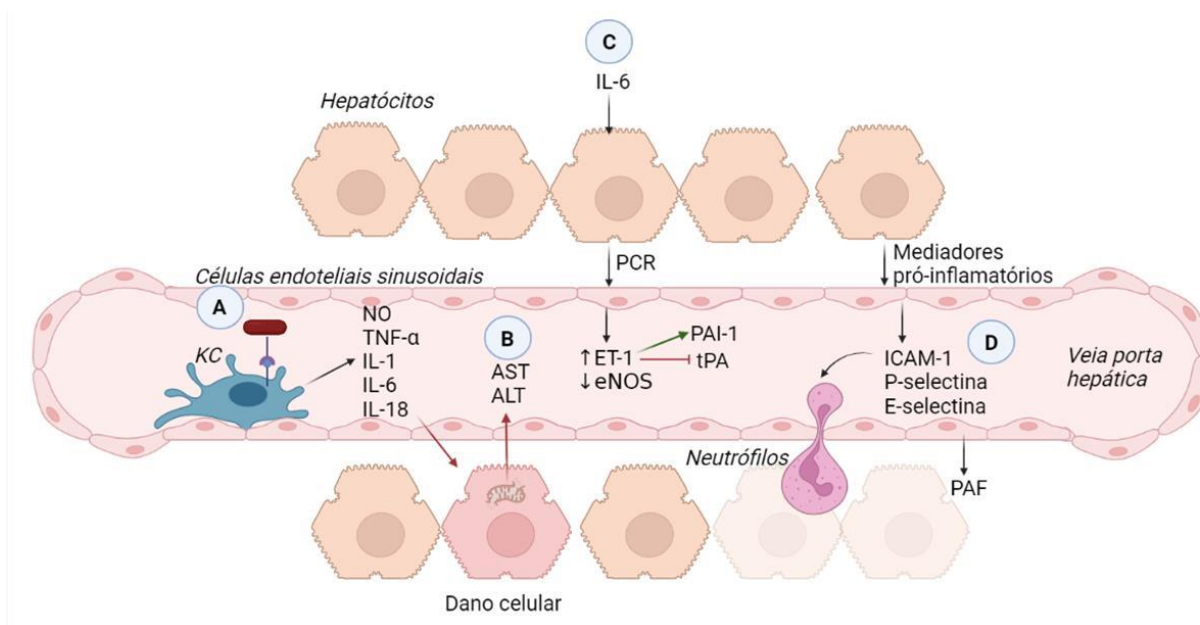
Na presença de patógenos e produtos bacterianos, as células de Kupffer são ativadas levando ao aumento de produção de mediadores pró-inflamatórios como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-18, além da formação de ERO e ERN, como o peroxinitrito levando ao dano nos hepatócitos (Figura 06-A) (KIM; CHOI, 2020). No interior dos hepatócitos especificamente no citoplasma e mitocôndria existem as enzimas alanina transaminase ou alanina aminotransferase (ALT ou TGP) que é responsável pela transferência do grupamento amina do glutamato para o piruvato, gerando alanina enquanto a enzima aspartato aminotransferase (AST ou TGO) irá transferir o grupamento amina do glutamato para o oxaloacetato gerando o aspartato. Estas enzimas hepáticas são consideradas indicadores de dano hepático, uma vez que durante a sepse ocorre disfunção mitocondrial nos hepatócitos a AST e ALT são rapidamente liberadas na corrente sanguínea (Figura 06-B). Nesse sentido, ao avaliar o índice da razão AST/ALT pode determinar

o prognóstico da disfunção hepática na sepse (EL-NAHHAL; AL_SHAREEF, 2018; ZHAO et al., 2020).

Durante a sepse os hepatócitos sob estímulo primário da IL-6, induz a produção de proteína C reativa (PCR), e esta por sua vez, irá diminuir a concentração do Ativador de Plasminogênio (tPA), responsável em destruir coágulos na parede vascular e aumentar a concentração de PAI-1, a qual tem um papel importante na clivagem de plasminogênio em plasmina inibindo conseqüentemente a fibrinólise levando à coagulação intravascular disseminada. Além disso, há redução da síntese hepática dos fatores pró-coagulantes (V, VII, X e protrombina) e anticoagulantes (PC, PS e AT) (TIPOE et al., 2018).

A PCR, também tem participação na regulação negativa na síntese de NO endotelial (eNOS), e aumento da ativação do peptídeo vasoconstritor endotelina (ET-1) pelas células endoteliais sinusoidais que fazem parte da veia porta hepática (Figura 06-C). Além disso, as células endoteliais sinusoidais são ativadas por endotoxinas como LPS, produtos bacterianos ou mediadores pró-inflamatórios proveniente dos hepatócitos aumentando a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, P-selectina e E-selectina) resultando na infiltração de neutrófilos para o sinusóide hepático. Além disso, promove a ativação e adesão plaquetária com conseqüente aumento de serotonina, NO e PAF (Figura 06-D) (GRACIA-SANCHO et al., 2021; WOŹNICA et al., 2018).

Figura 06. Desenvolvimento da disfunção hepática. (A) Células de Kupffer ativadas por produtos bacterianos, leva ao aumento de produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18, ERO e ERN ocasionando o dano hepático. (B) Hepatócitos danificados liberam AST e ALT na corrente sanguínea. (C) IL-6, nos hepatócitos induz a produção de PCR que irá estimular as células endoteliais sinusoidais a produzir ET-1 que por sua vez aumenta a PAI-1 e inibe a Tpa. (D) Os hepatócitos ativados secretam mediadores pró-inflamatórios que irão atuar nas células endoteliais promovendo a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, P-selectina e E-selectina), aumento do influxo de neutrófilos e adesão plaquetária. Além disso as células endoteliais ativadas irão produzir serotonina, NO e PAF que contribuí com a disfunção microvascular hepática.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

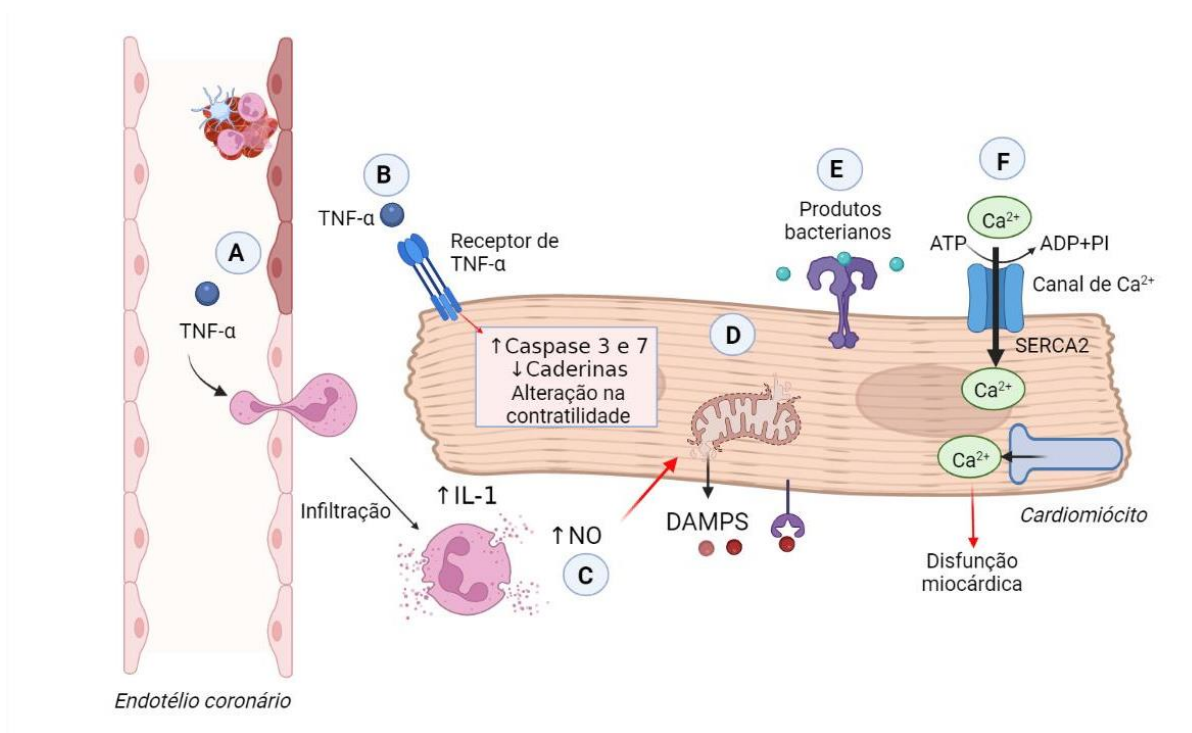
2.2.3 Desenvolvimento da disfunção cardíaca na sepsis

O aumento de mediadores pró-inflamatórios tais como as citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) em resposta a produtos bacterianos e a patógenos induzem a expressão de VCAM-1 no endotélio coronário aumentando o influxo de neutrófilos no miocárdio (Figura 07-A). O aumento de TNF- α nos cardiomiócitos aumenta a expressão das caspases 3 e 7 levando a apoptose celular, altera a arquitetura dos cardiomiócitos reduzindo a expressão de caderinas e altera a contratilidade cardíaca (Figura 07-B). Além disso, os neutrófilos ativados irão secretar IL-1 que leva depressão miocárdica séptica através do aumento da síntese de NO (Figura 07-C). (HABIMANA et al., 2020; SARAF et al., 2021).

Níveis elevados de NO, assim como de outros radicais contribuem para disfunção mitocondrial e lesão nos cardiomiócitos gerando DAMPs que geram fragmentos de DNA mitocondrial, caixa de grupo 1 de alta mobilidade (HMGB-1), proteínas de choque térmico (HSPs), citocromo C e entre outros (Figura 07-D). (HABIMANA et al., 2020; SILVIS et al., 2020). De acordo com (RAVIKUMAR et al., 2021), em pacientes sépticos a ativação de cardiomiócitos por produtos bacterianos como LPS resulta no aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e EROS que ocasiona disfunção da membrana mitocondrial e danos teciduais (Figura 07-E). Em condições fisiológicas, o Ca^{2+} entra nos cardiomiócitos através dos canais de cálcio tipo lento posteriormente armazenado no retículo sarcoplasmático (RS), no entanto, com a alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial ocorre aumento do vazamento de Ca^{2+} do RS, assim como deficiência da geração de ATP por mitocôndrias que reduz a

recaptação de Ca^{2+} pela SERCA2a (uma proteína dependente de ATP) no RS, levando a disfunção contrátil dos cardiomiócitos (Figura 07-F). (CARABALLO; JAIMES, 2019; RAVIKUMAR et al., 2021).

Figura 07. Desenvolvimento da disfunção cardíaca. (A) Mediadores pró-inflamatórios tais como $\text{TNF-}\alpha$ aumenta a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos (B) $\text{TNF-}\alpha$ nos cardiomiócitos resulta no aumento de Caspase 3,7 levando ao dano de cardiomiócitos, redução de caderinas e alteração na contratilidade cardíaca. (C) Os leucócitos ativados secretam IL-1 e NO que contribui na depressão miocárdica (D) O aumento de NO leva a disfunção mitocondrial e de DAMPs que são reconhecidos pelos cardiomiócitos. (E) Produtos bacterianos ativam os cardiomiócitos amplificando o processo inflamatório e alteração da permeabilidade mitocondrial. (F) A disfunção mitocondrial aumenta o vazamento de Ca^{2+} dos RS e reduz a recaptação destes íons pela SERCA2 Fonte: Autor próprio (2021).



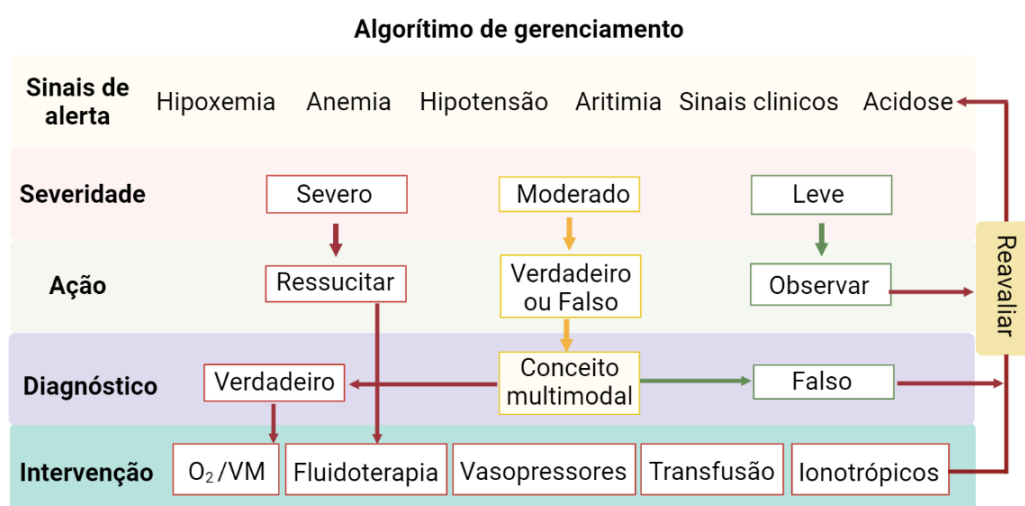
Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

2.3 TERAPIA NA SÍNDROME DA DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS

A sepse como discutido anteriormente consiste na resposta desregulada do paciente com liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo que pode resultar na disfunção de múltiplos órgãos (MOD) e conseqüentemente em óbito. O manejo de pacientes sépticos com prognóstico do desenvolvimento de disfunção orgânica tem caráter multidisciplinar com uso de antibióticos e suporte hemodinâmico individualizado, haja vista que com o desenvolvimento da disfunção microvascular leva o paciente à hipoperfusão ou hipóxia e como resultado disfunção cardíaca e hepática (ASIM; AMIN; EL-MENYAR, 2020; MEHTA; GILL, 2019).

Para isso é recomendado intervenções que estabilizem a oxigenação do paciente baseado nos sinais de alerta como hipoxemia, anemia, distúrbios no ritmo cardíaco, sinais clínicos entre outros. Assim que for detectado um sinal de alerta deve-se avaliar o grau de severidade, a partir disto deve-se realizar ressuscitação imediata com as intervenções necessárias caso seja grave, caso seja moderado deve se aplicar o conceito multimodal o qual é baseado na análise de índices tais como pressão arterial média, PaO₂, débito cardíaco, resistência vascular sistêmica entre outros. Caso seja confirmado o diagnóstico baseado no conceito multimodal deve-se aplicar as intervenções necessárias e posteriormente reavaliado. Por fim, na severidade leve o paciente deve ficar em observação e reavaliado (Figura 08) (VIRÁG et al., 2021).

Figura 08. Algoritmo de gerenciamento da gestão hemodinâmica individualizada.



Fonte: Adaptado de (VIRÁG et al., 2021).

O uso de antioxidantes na disfunção orgânicas tais como N-acetilcisteína, albumina, vitamina C são promissores na preservação função endotelial, otimizando a microcirculação e consequentemente evitando o desenvolvimento de disfunção hepática e cardíaca (JOFFRE; HELLMAN, 2021). Nesse contexto, o uso de antioxidantes tem-se mostrado promissor tanto em modelos experimentais como na clínica. Recentemente nossos estudos mostraram que o nutracêutico *A.brasiliensis* reduziu a resposta inflamatória e a carga bacteriana aumentando a sobrevivência dos animais submetidos à CLP. Além disso, o extrato deste cogumelo protegeu os animais do estresse oxidativo bem como foi capaz de reduzir os níveis dos marcadores oxidativos (NAVEGANTES-LIMA et al., 2020b).

Em humanos, (ZHOU et al., 2012) a administração parentérica de ascorbato demonstrou prevenir a disfunção microvascular e melhorar a sobrevivência em modelos experimentais de sepse.

Em humanos, a suplementação com dieta a base de óleo de peixe (ômega 3), ácido γ -linolênico e vitaminas antioxidantes (E,C e B), reduziu a mortalidade, melhorou o padrão de oxigenação e tiveram um menor desenvolvimento de disfunção cardiovascular, renal, hematológica, metabólica e neurológica comparada aos pacientes-controle (PONTES-ARRUDA; ARAGÃO; ALBUQUERQUE, 2006).

Nesse sentido, a terapia com antioxidantes e imunomoduladores como o *A.brasiliensis* isolado ou concomitante com a terapia convencional poderá reduzir o estresse oxidativo, aumentar eficiência dos antimicrobianos, conseqüentemente a imunidade do paciente e sua resposta no tratamento, reduzindo desta forma a mortalidade.

2.4 *Agaricus brasiliensis* – COGUMELO DO SOL

2.4.1 Classificação taxonômica da espécie e composição química

O cogumelo *A.brasiliensis* pertence ao reino Fungi, divisão Basidiomycota da ordem Agaricales, família Agaricaceae foi encontrado em 1960 na cidade Piedade no interior do Estado de São Paulo (Brasil), e posteriormente foi enviado ao Japão, para estudos no Institute Iwaide. Em 1967, Dr. Heinemann, cientista belga, identificou o fungo e o denominou de *Agaricus blazei* Murill, espécie natural na América do Norte, mas já descrita por W.A. Murill, em 1945. Wasser et al. (2002) propuseram para esta espécie nativa do Brasil uma nova denominação, *Agaricus brasiliensis* (Quadro 01) (MOURÃO et al., 2011a).

Quadro 01. Classificação Taxonômica de *Agaricus brasiliensis*.

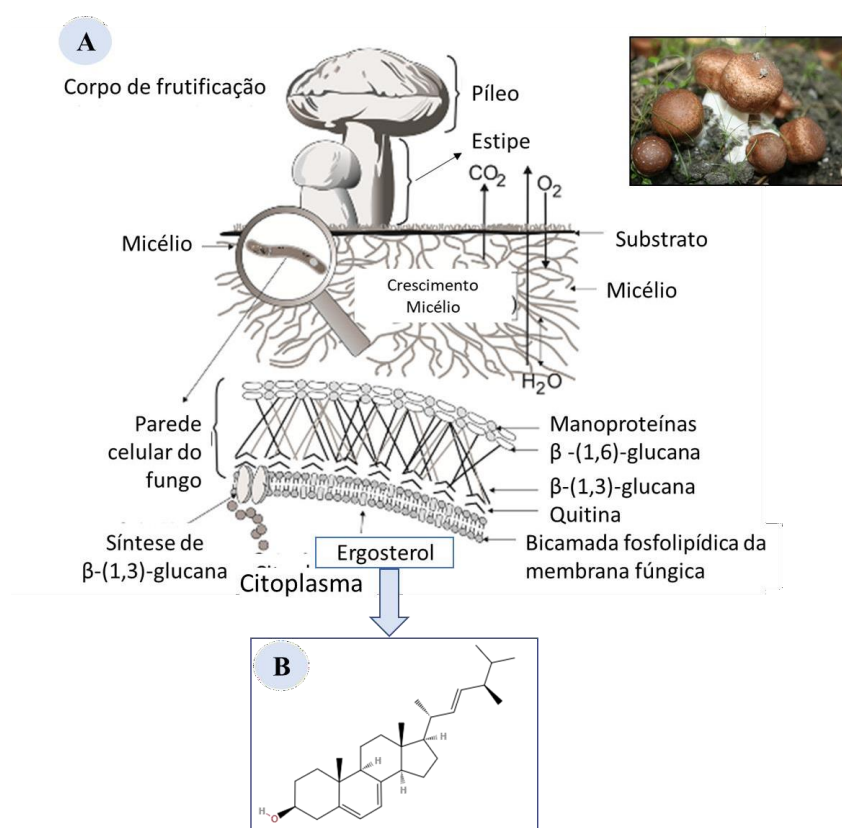
CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA			
	HEINEMANN (1967)	WASSER (2002)	KERRIGAN (2005)
Reino:	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>
Divisão:	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
Subdivisão:	<i>Homobasidiomycetidade</i>	<i>Homobasidiomycetidae</i>	-
Ordem:	<i>Agaricales</i>	<i>Agaricales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

Fonte: Mourão et al., (2011)

O *A.brasiliensis* (Figura 09-A) tem em sua composição carboidratos tais como glucose, inositol, manose; aminoácidos como ácido aspártico, metionina e ácido glutâmico; flavonóides como ácido cafeico, ácido cítrico e ácido clorogênico; Polifenóis tais como ácido gálico e pirogalol; ácidos graxos como ácido linoleico e ácido palmítico; polissacarídeos como o α -glucana e β -glucana e ergosterol (DA SILVA CAMPELO et al., 2021)

O ergosterol bem como outros derivados de esterol, como fitosteróis e agarol, fazem parte da porção lipídica de *A. brasiliensis*, é uma molécula estruturalmente semelhante ao colesterol (Figura 09-B), possuindo características essenciais para sua atividade nas membranas celulares, como a presença do grupo $3\beta\text{-OH}$ e a ausência de grupos metil no C-4 e C-14. Essas características químicas permitem que o ergosterol seja absorvido do meio ambiente pelas células humanas (DA SILVA et al., 2017; MISGIATI et al., 2021). Além disso, o ergosterol é um precursor da vitamina D₂, o qual ao ser exposto a irradiação UV-B é convertida em ergocalciferol (vitamina D₂) que é responsável por aumentar a absorção de cálcio para a formação de ossos e dentes, prevenção de raquitismo e osteoporose e manutenção da atividade imunológica (ROMÁN-HIDALGO et al., 2021).

Figura 09: O cogumelo *Agaricus brasiliensis* e a estrutura química do ergosterol. (A) *Agaricus brasiliensis*. (B) Estrutura da Ergosterol.



Fonte: Adaptado de Mantovani (2008) e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ergosterol>

2.4.2 Propriedades farmacológicas do *A. brasiliensis*

O *A. brasiliensis* é conhecido por sua capacidade antitumoral como demonstrada anteriormente por (SOVRANI et al., 2017), mostraram que os exo-biopolímeros de *A. brasiliensis* foram capazes de inibir 46% do carcinossarcoma 256 de Walker em ratos Wistar

de maneira dose-dependente. Posteriormente, (RUBEL et al., 2018) ao suplementar com 50% de micélio de *A.brasiliensis* a dieta de camundongos swiss inoculados com sarcoma 180 apresentaram inibição do crescimento tumoral e recuperação do peso corporal. De acordo com (CHENG et al., 2020) a atividade antitumoral é devido a capacidade do *A.brasiliensis* induzir apoptose de células tumorais através da regulação positiva de BAX, das caspases 3,8 e 9, BCL-2.

A atividade antitumoral do nutracêutico *A.brasiliensis* pode ser resultado do seu efeito imunomodulador. Anteriormente nosso grupo mostrou a propriedade imunomoduladora *in vitro* de *A.brasiliensis*, no qual o tratamento com micélio de *A. brasiliensis* (LPB) foi capaz de inibir a proliferação de esplenócitos estimulados com o mitógeno e reduzir os níveis de NO produzidos por macrófagos. Por outro lado, o tratamento com o exopolissacarídeo de *A. brasiliensis* teve um efeito oposto, acentuando a proliferação de esplenócitos, mesmo na ausência do mitógeno, assim como a produção de NO por macrófagos peritoneais (NAVEGANTES et al., 2013). (SANTA et al., 2014), também demonstraram um aumento de células TCD4+ e subtipos de células CD4+ CD25+ em órgãos periféricos de camundongos após a administração de *A. brasiliensis* por via oral.

Recentemente, em nossos estudos o *A.brasiliensis* se mostrou promissor como terapia na sepse. O tratamento oral de camundongos 24 horas e no momento da indução de sepse pelo modelo de CLP, foi capaz de aumentar sobrevida de todos os animais pelo menos por 16 dias, recuperar o peso corporal a partir do 4º dia (NAVEGANTES-LIMA et al., 2020b). Corroborando, (BERNARDSHAW et al., 2006) e Hetland et al. (2013), mostraram que tratamento com *A.brasiliensis* em camundongos BALB/c um dia antes da indução da peritonite polimicrobiana também aumentou a taxa de sobrevida, mostrando a eficácia do cogumelo quando administrado profilaticamente.

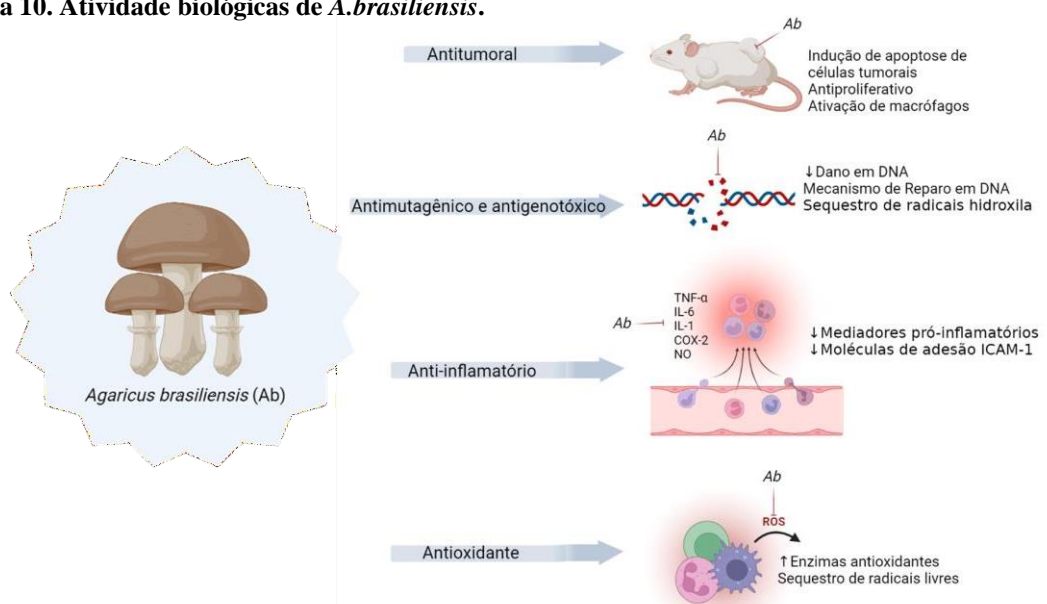
Ainda *in vivo*, em nosso estudo o *A.brasiliensis* foi capaz de reduzir a carga bacteriana de forma significativa com 24 horas após CLP no sangue e no fígado, apresentando níveis indetectáveis (NAVEGANTES-LIMA et al., 2020b). Segundo (LIMA; GRIS; KARNIKOWSKI, 2016)) o mecanismo pelo qual o cogumelo tem ação antimicrobiana *in vivo* e não *in vitro*, deve-se a interação das substâncias bioativas como o polissacarídeo glucana presente no fungo que tem a capacidade de aumentar a atividade antimicrobiana de células mononucleares e polimorfonucleares, intensificando a atividade funcional (VANNUCCI et al., 2013). Ainda Tryggstad et al. (2013) sugerem que o cogumelo atua na ativação de NF-κB através de TLR-2.

Em processos inflamatórios intensos, o *A. brasiliensis* atua como anti-inflamatório devidos a compostos como ácido linoleico e ergosterol. *In vitro*, RAW 264.7 estimuladas com LPS, o tratamento com ácido linoleico isolado de *A. brasiliensis* mostrou ser capaz de inibir os níveis de NO e mediadores pró-inflamatórios tais como TNF- α , IL-6, IL-1 β através da supressão de NF-kB e ativação da PPAR α (SAIKI et al., 2017).

A sua atividade citoprotetora e antioxidante, também foi observada em nosso estudo, em que o tratamento com *A. brasiliensis* em animais com sepse foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica resultante da sepse, com redução dos níveis de malonaldeído (MDA) no soro, no coração e no fígado. Além disso, o *A. brasiliensis* aumentou a capacidade antioxidante total nos órgãos, especialmente fígado dos animais com sepse. Ainda, foi possível observar uma redução significativa de ERO intracelular no sítio inflamatório dos animais pré-tratados com o cogumelo em comparação aos animais pré-tratados com salina (NAVEGANTES-LIMA et al., 2020b). Segundo a literatura, esta atividade antioxidante do *A. brasiliensis* é atribuída ao ergosterol e a β -D-glucanas (MOURÃO et al., 2011b).

Em resumo as atividades biológicas do *A. brasiliensis* na literatura são antitumoral, antimutagênico, antigenotóxica, imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante (Figura 10).

Figura 10. Atividade biológicas de *A. brasiliensis*.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Considerando as propriedades farmacológicas imunomoduladora e antioxidante do nutracêutico *A. brasiliensis* e sua eficácia no uso de camundongos sépticos previamente com aumento de sobrevivência, com redução da carga bacteriana e redução do estresse oxidativo. É de

grande importância investigar a ação da Fração lipídica do cogumelo *A.brasiliensis* rica em ergosterol no tratamento de camundongos submetidos à sepse letal por ligadura e perfuração cecal (CLP) com ênfase na investigação do seu efeito no desenvolvimento da disfunção microvascular, cardíaca e hepática.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade da Fração lipídica do *Agaricus brasiliensis* (FLAb) isolada *in vitro* e avaliar o efeito do tratamento com FLAb isolada ou associada ao antibiótico ertapenem (F-ERTA) nos parâmetros da coagulação, antioxidante e imunomodulador no modelo de sepse letal em murino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliação da atividade *in vitro*

- a. Avaliar a citotoxicidade da FLAb na linhagem RAW-Luc;
- b. Avaliar a capacidade antioxidante da FLAb;
- c. Avaliar a capacidade fagocítica da FLAb;
- d. Avaliar a atividade de NF- κ B em linhagem RAW-Luc linhagem estimuladas com LPS e FLAb;
- e. Avaliar a concentração de nitritos em linhagem RAW-Luc estimuladas com LPS e FLAb;
- f. Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em linhagem RAW-Luc estimuladas com FLAb;

3.2.2 Avaliação do efeito do tratamento FLAb e F-ERTA na disfunção microvascular, hepática e cardíaca em modelo de sepse letal em murino

- a. Avaliar o efeito da FLAb / F-Erta na sobrevivência, parâmetros clínicos e carga bacteriana nos animais com sepse induzida pelo modelo de CLP;
- b. Avaliar o efeito da FLAb / F-Erta sobre os seguintes parâmetros no sangue, coração e no fígado dos camundongos com sepse induzida por CLP:
 - Parâmetros hematológicos tais como: contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos, número de plaquetas, contagem global de leucócitos e absoluto presentes no sangue;

- Parâmetros da coagulação por meio do tempo de retração do coágulo, tempo de protrombina e de tromboplastina parcial ativada;
- Parâmetros bioquímicos tais como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST);
- Parâmetros do estresse oxidativo: produção de NO, quantificação de ERO intracelular, glutatona reduzida (GSH);
- Produção da enzima Mieloperoxidase (MPO);
- Citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β e IL-17 e anti-inflamatórias fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e IL-10;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Neste estudo foram utilizados Azul de trypan 0,4% (SIGMA), ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA) 5% (BIOLAB), Ágar Muller Hinton, tampão fosfato salina (PBS) 10x (800 g de NaCl, 20 g de KCl, 144 g de Na₂HPO₄ e 24 g de KH₂PO₄ em 8 L de água destilada), reagente de griess (Sulfanilamida 1% (w/v) em H₃PO₄ 10% e o segundo reagente que é formado por alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% em água).

4.2 FORNECIMENTO E PREPARO DA FLAb

O extrato de FLAb foi fornecido gentilmente pela professora Herta Stuz Dalla Santa da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Paraná, Brasil. O cogumelo *A. brasiliensis* foi cultivado em *Ilex paraguariensis* de acordo com a metodologia realizada por (MOKOCHINSKI et al., 2015) e posteriormente foi realizada a extração lipídica. Para a extração da FLAb, primeiramente as amostras foram moídas a 60 mesh e foi calculada sua umidade inicial. Foram inseridas 250g de amostra em tubinhos de 5 ml com veda rosca em suas bocas, em quintuplicata para cada uma das 3 amostras. Foi adicionado a cada tubo 2 ml de metanol e 0,5 ml de NaOH 2 mol/L. Os tubos foram tampados e aquecidos em microondas por 20 segundos em potência 5. Foram deixados para esfriar por 15 min. Foi adicionado 2 ml de etanol aos tubos e foram agitados por 30s e então centrifugados por 3 minutos. Foi retirado o sobrenadante dos tubos com micropipeta e colocado em um tubo limpo, em seguida no tubo contendo a amostra foram adicionados mais 2 ml de etanol, agitado por 30 seg. e centrifugação por 3 min, retirando-se o sobrenadante novamente. Foi adicionado mais 1 ml de etanol, agitado por 30 s e centrifugado por 3 min. Foi então retirado o sobrenadante. O etanol foi evaporado a 45°C sob aeração e após os tubos foram congelados.

Posteriormente, foi preparada uma solução mãe para preparar as concentrações (1,25 e 5 µg/mL para os testes *in vitro* e para preparar a dose de 0,2mg/Kg por animal. Para o estabelecimento do volume correto da FLAb a ser administrada no camundongo foram realizados cálculos dos pesos dos animais. Cada animal foi pesado antes da administração da dose correspondente.

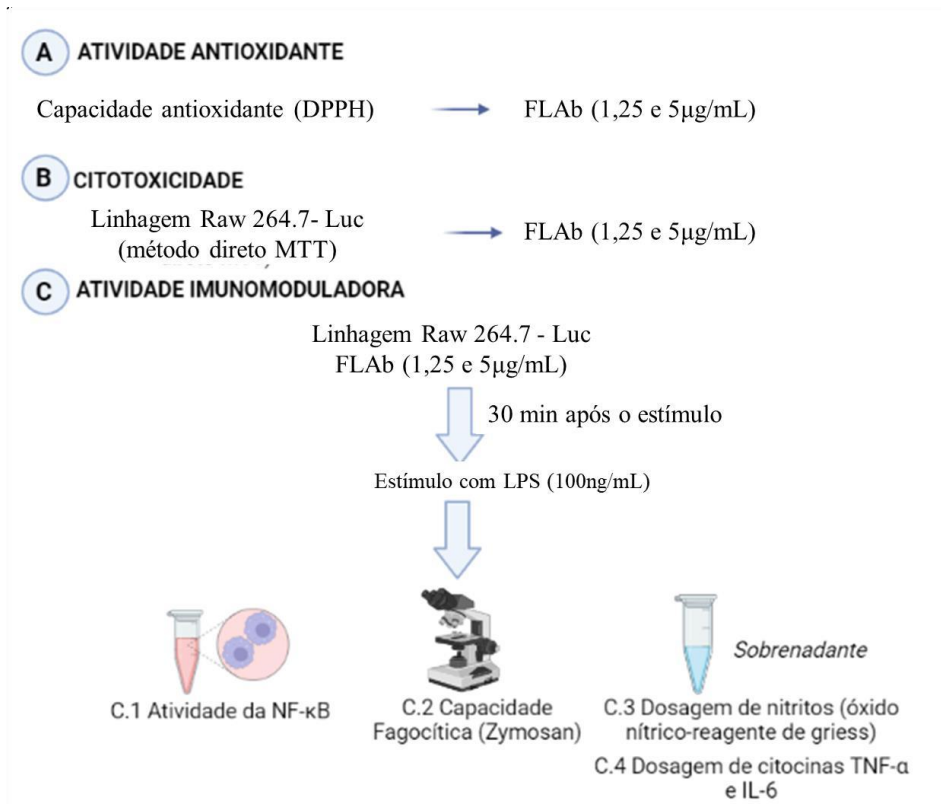
4.3 AVALIAÇÃO *in vitro* DA FLAb

Os testes *in vitro* de diferentes concentrações da FLAb (1,25 e 5 µg/mL) consistiu em avaliar a citotoxicidade em linhagem de macrófagos RAW 264.7-Luc e verificar a capacidade

antioxidante, capacidade fagocítica e com o sobrenadante foi realizado a dosagem de nitritos e citocinas TNF- α , IL-6. Além disso, foi avaliada atividade de NF- κ B em linhagem RAW-Luc estimuladas com LPS e FLAb.

A figura 11 mostra o delineamento experimental *in vitro*.

Figura 11. Delineamento experimental *in vitro* da FLAb em diferentes concentrações (1,25; 5; 12,5; 25 e 100 μ g/mL). (A) Avaliação da atividade antioxidante da FLAb pelo método DPPH. (B) Avaliação da citotoxicidade em linhagem RAW-Luc pelo método direto MTT. (C) Avaliação da atividade imunomoduladora da FLAb em linhagem RAW-Luc através da (C.1) atividade da NF- κ B; (C.2) capacidade fagocítica; (C.3) dosagem de nitritos a partir do sobrenadante e (C.4) dosagem de citocinas TNF- α e IL-6.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

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

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

O controle negativo foi feito pela adição de etanol e DPPH e o controle positivo foi feito pela adição de solução de um padrão (TROLOX) e DPPH. Em um tubo foi adicionado 50µL de amostra de FLAb (1,25 e 5 µg/mL), 600µL de uma solução de DPPH 0,1mM, exceto nos brancos, e foi adicionado 350 µL de água destilada, aguardou-se 30 minutos a 37°C e realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 517nm.

4.3.2 Citotoxicidade pelo método direto 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT)

Este ensaio foi realizado adaptado 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. A linhagem de macrófagos RAW 264.7-Luc foi distribuída em microplaca de 96 poços, de fundo U, células (2×10^5 células/mL) e adicionado posteriormente FLAb (1,25 e 5 µg/mL); o controle positivo – Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH®) a 10% e controle negativo – somente as células com RPMI. Posteriormente foi incubado por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C.

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

4.3.3 Avaliação da capacidade fagocítica

Alíquotas (0,1mL) da linhagem RAW-Luc (10^6 céls/mL) foram adicionados aos poços de placas de cultivo celular de fundo chato de 96 poços. Em seguida foi adicionado 10µL de FLAb (1,25; 5; 12,5; 25 e 100 µg/mL) e incubado por 30 minutos em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C e posteriormente, foi adicionado 10µL de LPS (100ng/mL) e incubado novamente por 30 minutos em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C. Em seguida foi adicionado 20µL de zymosan opsonizado fixadas em vermelho neutro e então incubado por 30 minutos em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C. Após a incubação, 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 absorbância de 550nm. Os resultados foram expressos em abs/número de células (BONATTO et al. 2004).

4.3.4 Ensaio de luciferase em linhagem RAW 264.7 – Luc

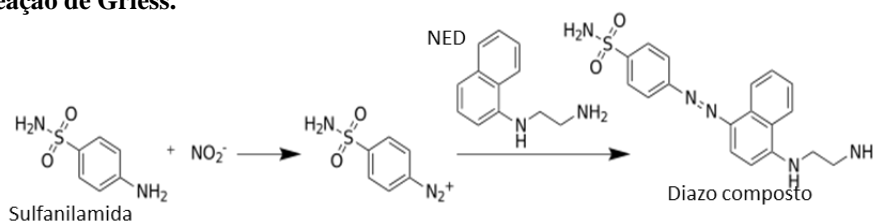
Para avaliar a atividade de NF- κ B foi utilizado o protocolo de (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015) em que macrófagos RAW 264.7-Luc (300.000 células/poço) estavelmente transfectadas com o gene NF- κ B-pLUC para expressarem luciferase através do fator de transcrição NF- κ B, em placa de 24 poços foram cultivadas em meio RPMI (Sigma) completo *overnight* em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C. Após o tempo de incubação foi retirado o sobrenadante e adicionado 200 μ L RPMI (Sigma) completo e 10 μ L de FLAb (1,25 e 5 μ g/mL) em seguida incubado por seis horas em estufa de CO₂ a 5% a 37 °C. Posteriormente a placa foi centrifugada 450G por cinco minutos a 4°C. Foi retirado o sobrenadante e armazenado para dosagem de citocinas e de nitritos. Na microplaca foram adicionados 50 μ L de tampão de lise 1X. Em seguida uma alíquota de 10 μ L foi transferida para uma microplaca branca opaca de 96 poços junto a 25 μ L do reagente para ensaio de luciferase (Promega, Madison, WI, EUA). A atividade da luciferase foi determinada em um luminômetro (FlexStation 3 Microplate Reader, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções o fabricante. Os resultados foram expressos como atividade relativa da luciferase.

4.3.5 Dosagem de nitritos

O NO foi mensurado como nitrito (NO₂). A concentração de nitrito foi mensurada pela reação de Griess. No qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração rosa-avermelhada, de acordo com a equação da figura 12. A reação é controlada pelo tempo, e o produto é determinado após 10 minutos.

Para tal, colocou-se 100 μ L do sobrenadante do cultivo celular e 100 μ L do reagente de Griess e posteriormente foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e absorbância mensurada a 550 nm. A concentração de NO₂ foi determinada de uma curva-padrão feita com NaNO₂ e expressa em μ M (STUEHR e MALETTA, 1985).

Figura 12. Reação de Griess.



Fonte: Ramos et al. (2006)

4.3.6 Dosagem de citocinas

As citocinas TNF- α e IL-6, foram quantificadas por Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) usando o kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, Canada) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO FLAB E F-ERTA *in vivo*

4.4.1 Comitê de ética

Os animais foram obtidos após apreciação e aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEPAE- UFPA) e aceito sob parecer nº 8355050418 (ANEXO 1). Os animais utilizados na presente investigação foram manipulados segundo a legislação nacional em vigor de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (CONCEA, 2013).

4.4.2 Obtenção dos animais e eutanásia

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss machos e fêmeas (n=65), com 30 a 90 dias de idade, pesando em torno de 20 a 30 gramas, oriundos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. O número de animais que foram utilizados se restringiu ao mínimo necessário para os ensaios pré-clínicos. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados no projeto 65 animais distribuídos em 5 grupos para sobrevida (Sham – n=5 ; CLP + Sal – n=5; CLP + Erta– n=5; CLP + FLAb – n=5 e CLP + F-Erta – n= 5) e 4 (Sham– n=10; CLP + Sal– n=10; CLP + FLAb – n=10 e CLP + F-Erta– n=10) para avaliação dos parâmetros da coagulação e no órgãos (coração e fígado), a atividade antioxidante e imunomoduladora. Todos os animais experimentais foram mortos pelo método recomendado para a Ordem Rodentia - Roedores e pequenos mamíferos - que é o da exsanguinação por punção cardíaca após anestesia geral de acordo com a Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012 do CONCEA. Os animais 6 ou 24 horas após a realização do modelo experimental da sepse foram anestesiados para a eutanásia com cetamina (75mg/kg) e xilazina (15mg/kg) intraperitoneal por meio do aprofundamento da anestesia (dobro do valor)

seguido de exsanguinação por punção cardíaca. Todos os animais experimentais eutanasiados foram mantidos em freezer até o momento do descarte pela empresa responsável, seguindo normas internacionais.

4.4.3 Sobrevida e parâmetros clínicos

4.4.3.1 Grupos de estudos para sobrevida

Para avaliação da sobrevida os animais foram divididos em cinco grupos (n=5 animais/grupo) totalizando 25 animais que foram acompanhados por sete dias (Figura 13).

GRUPO 1 (Controle+Sal): Animais receberam tratamento com solução salina 0,9% estéril por i.p (200µL) 30 minutos após a CLP e depois de 12/12h por 7 dias n= 5 animais;

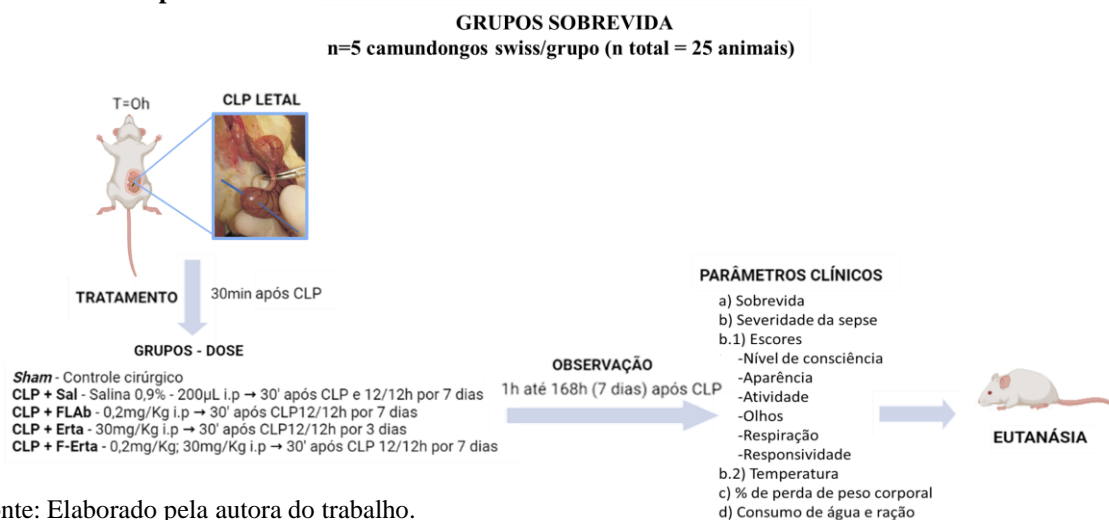
GRUPO 2 (Controle SHAM): Animais receberam exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da indução de sepse e não receberam tratamento n= 5 animais;

GRUPO 3 (CLP+ERTA): Animais receberam tratamento com Ertapenem (ERTA, 30mg/Kg) por via i.p 30 minutos após a CLP e depois de 12/12h por 3 dias n= 5 animais;

GRUPO 4 (CLP + FLAb): Animais receberam tratamento da FLAb (0,2 mg/Kg/camundongo) por i.p 30 minutos após a CLP e depois de 12/12h por 7 dias n= 5 animais;

GRUPO 5 (CLP + F-Erta): Animais receberam tratamento da FLAb (0,2mg/Kg/camundongo) 30 minutos após a CLP e depois de 12/12h por 7 dias e receberam juntamente o tratamento com Ertapenem (Erta, 30mg/Kg) por via i.p 30 minutos após a CLP e depois de 12/12h por 3 dias – n= 5 animais;

Figura 13. Delineamento experimental para avaliação do efeito da FLAb na sobrevida e parâmetros clínicos em modelo de sepse em murinos.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Foi construída uma curva de sobrevida dos animais em relação ao tempo decorrido após o procedimento. E a fim de avaliar as alterações fisiológicas dos camundongos submetidos a CLP e determinar a severidade da sepse durante as 168 horas (7 dias) da avaliação da sobrevida, foi utilizado o *Murine Sepsis Score* (MSS) (Quadro 02) duas horas após a indução da sepse até o fim dos sete dias. Os animais foram avaliados por três pesquisadores de maneira simples-cego em que somente quem manipulava as gaiolas sabiam de que grupo se tratava. Inicialmente de uma em uma hora até as 6 horas, posteriormente de duas em duas horas até as 24 horas após a CLP. Posteriormente os animais foram avaliados duas vezes ao dia até completar os sete dias da avaliação da sobrevida.

Os camundongos foram submetidos à eutanásia se o MSS em qualquer momento fosse maior que 21 pontos, ou se os pontos atribuídos à frequência respiratória ou a qualidade fosse maior que 3.

Quadro 02. Escore de sepse em murinos.

Parâmetros	Escore			
	0	1	2	3
Aparência	Pelo liso	Pelo levemente franzido	A maioria dos pelos nas costas está em pé	Piloereção, aparência inchada
Nível de consciência	Ativo	Ativo, mas evita ficar de pé	Ativo somente quando é provocado	Não responde mesmo quando provocado
Atividade	Normal	Evita o consumo de ração e água, além de não correr.	Estacionário	Estacionário, mesmo quando provocado
Resposta ao estímulo	Normal	Resposta retardada a estímulos auditivos	Resposta lenta	Sem resposta a estímulos
Olhos	Abertos	Parcialmente abertos, presença de secreções	Quase que totalmente fechados, presença de secreções	Completamente fechado
Respiração	Qualidade da respiração normal	Períodos de respiração difícil	Respiração difícil consistentemente	Respiração difícil e ofegante

Fonte: adaptado de Mai et al. 2018.

O escore MSS foi desenvolvido por (SHRUM et al., 2014) e adaptado por (MAI et al., 2018)). Este escore é análogo ao *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE II), um índice utilizado em UTI para avaliar o prognóstico do paciente através de variáveis fisiológicas tais como temperatura, frequência cardíaca, escala de Glasgow entre outros (MORENO; NASSAR, 2017). Além disso outros parâmetros foram avaliados duas vezes ao dia, tais como: peso corporal, temperatura corporal, consumo de água e de ração.

4.4.4 Grupos experimentais e esquema de tratamento para avaliação dos parâmetros da coagulação, estresse oxidativo e imunomodulador.

Para avaliação das disfunções microvascular, hepática e cardíaca na sepse, os animais foram divididos em quatro grupos (n=5 animais/grupo) em dois tempos (6h e 24h), totalizando 40 animais. Os animais foram tratados 30 minutos após a indução da sepse somente (Grupo 6h) ou 30 minutos, 6h e 12 h após a CLP (Grupo 24h), passado o tempo foi induzido a eutanásia nos tempos de 6 e 24 horas após a indução da sepse que foram acompanhados por sete dias (Figura 14).

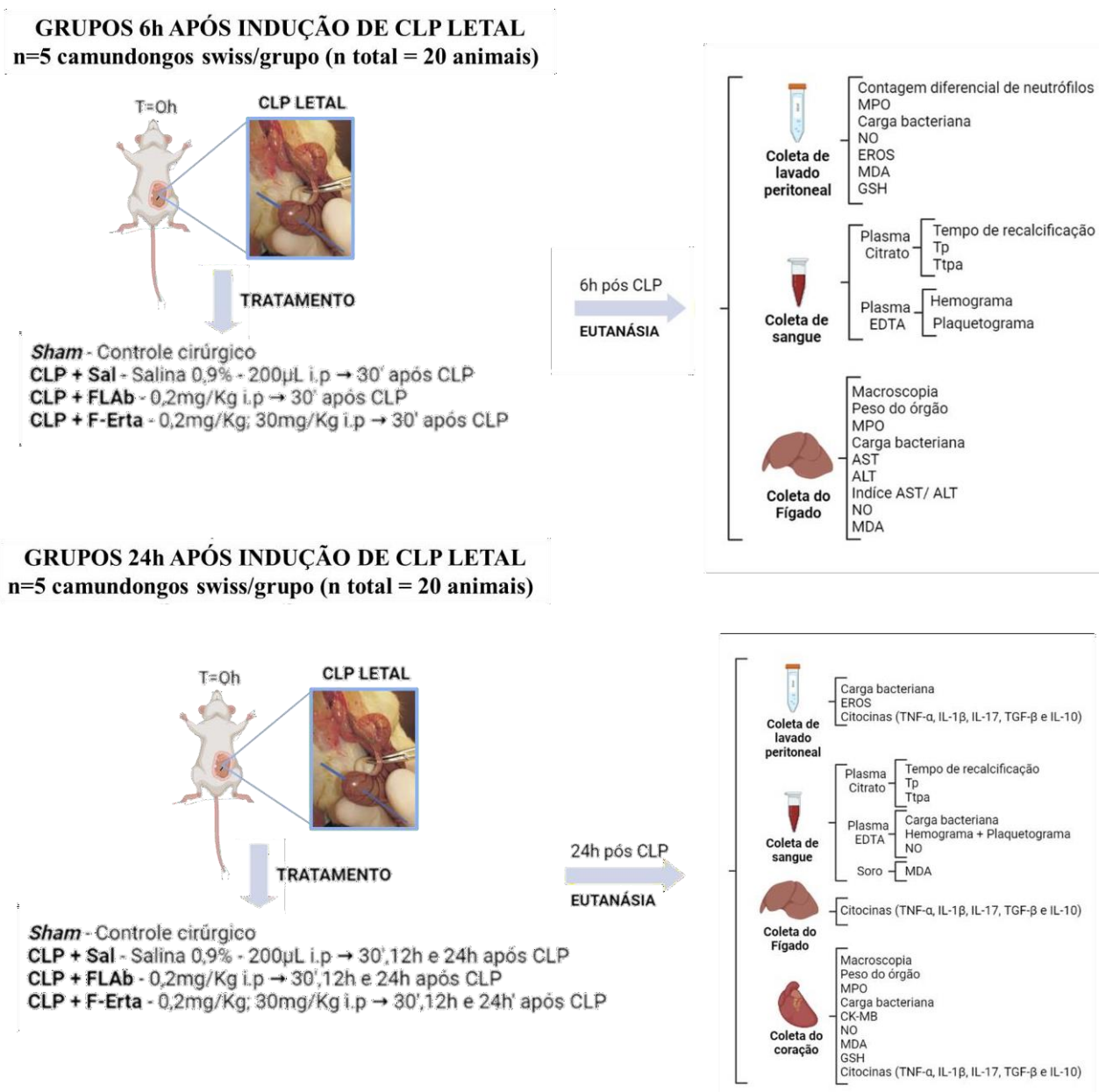
GRUPO 1 (SHAM): Animais receberam exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da indução de sepse e não receberam tratamento, n= 5 animais/tempo;

GRUPO 2 (CLP+Salina): Animais receberam tratamento com solução salina 0,9% estéril por i.p), n= 5 animais/tempo;

GRUPO 3 (CLP + FLAb): Animais receberam tratamento da FLAb (0,2mg/Kgcamundongo) por i.p., n= 5 animais/tempo;

GRUPO 4 (CLP + F-ERTA): Animais receberam tratamento da FLAb (0,2mg/Kg/camundongo) juntamente o tratamento com Ertapenem (Erta, 30mg/Kg) por via i.p, n= 5 animais/tempo.

Figura 14. Delineamento experimental para avaliação do efeito da FLAb na disfunção orgânica em modelo de sepse em murinos.



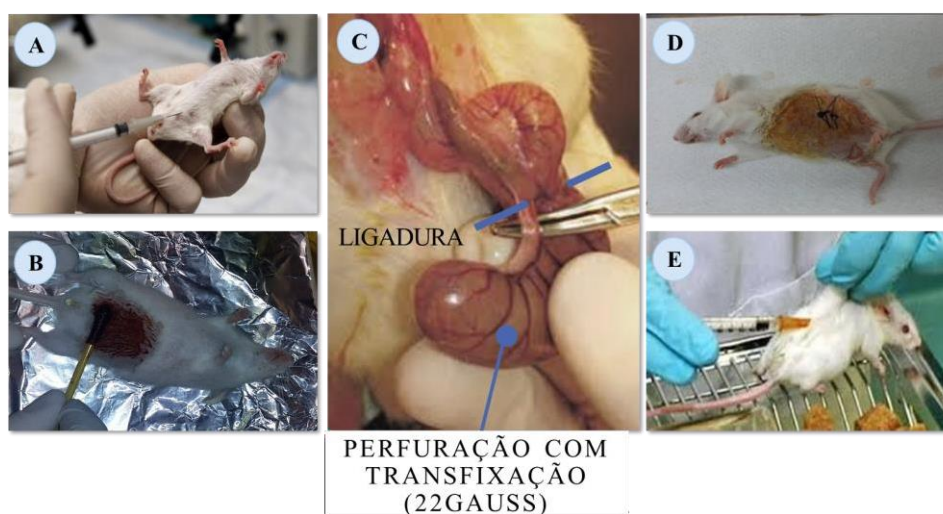
Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

4.4.5 Modelo de sepse letal induzida por CLP

Os camundongos (*Mus musculus*) foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (75mg/kg) e xilazina (15mg/kg), na proporção 1:1 por via intraperitoneal, quadrante lateral inferior direito, utilizando agulha 25x5 mm. Após a anestesia geral, cuja profundidade foi avaliada pela ausência do reflexo podal, foi realizada a depilação da parede abdominal, a assepsia do campo operatório com povidona e álcool a 70°. 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 próximo a válvula ileocecal. Após a ligadura, o coto isolado do ceco foi transfixado uma vez com a agulha de 18 gauss a partir do ponto de ligadura até a porção mais distal do ceco (a fim de induzir sepse letal). 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; LOCKS, 2014). Após o procedimento o animal foi suturado com um fio de seda 3-0, e a região limpa com álcool 70°, posteriormente foi administrado 1 mL de solução salina estéril (a 37°C) subcutâneo, para a desidratação. Durante o tratamento foi ministrado Bupremorfina (0,05 a 0,1mg/kg) para as dores provenientes do procedimento cirúrgico e para os animais controle-sham (da cirurgia), o ceco foi exteriorizado sem a realização da transfixação. Os animais foram colocados em gaiolas pós-operatória (com pisos aramados em aço inox) individuais, sob luz incandescente por 1 hora (Figura 15).

Figura 15. Procedimento da indução da sepse letal por CLP. (A) Administração de 60µL anestésico por via intraperitoneal em camundongos swiss. (B) Assepsia da região abdominal com povidona e álcool 70° após a raspagem. (C) Exteriorização do ceco e exposição das fezes após a perfuração. (D) Camundongo após a sutura com a assepsia da região. (E) Administração de 1mL de solução fisiológica 0,9%.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

4.4.6 Obtenção de amostras

4.4.6.1 Coleta do sangue

Após a sedação foi realizada a coleta da amostra de sangue, por punção cardíaca de acordo com Hoff, (2000) após 6 ou 24 horas de indução de CLP. O volume total de sangue coletado foi de aproximadamente de 1mL. O sangue foi distribuído em eppendorfs contendo anticoagulantes (heparina, EDTA ou citrato) e um sem aditivo.

Para obtenção do plasma, as amostras heparinizadas e citratadas foram centrifugadas a 1600xg durante 15 minutos. As amostras de plasma foram separadas dos elementos figurados e foram armazenadas em -20°C. Para a obtenção do soro, o tubo sem anticoagulante foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos. A amostra de soro foi separada do elemento figurado e armazenado a -80°C até análise.

4.4.6.2 Coleta e preparo dos órgãos

O coração e o fígado dos animais foram coletados 6 e/ou 24 horas após a CLP. Após a coleta foram lavados com PBS 1x e separado em três partes, a primeira parte foi pesado e armazenado em microtubos de 1,5mL para posteriormente macerar em homogeneizador de tecidos (Ultra Turrax T25 Basic) na presença de PBS 1X e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm para que o sobrenadante seja coletado em eppendorfs devidamente identificados e mantidos em freezer -80°C até o momento das análises. A segunda parte dos órgãos foram armazenado em paraformaldeído com a finalidade de assegurar a preservação das estruturas morfológicas dos tecidos. E a terceira parte dos órgãos foram coletado em solução tampão (monobásico e dibásico) para posterior dosagem da enzima mieloperoxidase.

4.4.7 Avaliação da carga bacteriana

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as amostras coletadas 6 ou 24h após a CLP. Para a quantificação da carga bacteriana, foram retirados 100 µL da amostra (sangue, lavado peritoneal e sobrenadante do homogeinado do fígado e coração) e realizada diluições seriadas com PBS 1x 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 cultivada em estufa bacteriológica na temperatura de ± 37 °C, para posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 24 h.

4.4.8 Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

4.4.8.1 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as amostras coletadas (plasma, lavado peritoneal e sobrenadante do homogeinado do fígado e coração) 6 ou 24h após a CLP e seguido de acordo com o item 4.2.5 descrito anteriormente.

4.4.8.2 *Quantificação da Liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelular*

O lavado peritoneal foi centrifugado a 1800 g x por 10 min e em seguida as células foram lavadas duas vezes em PBS. Após a lavagem foi adicionado 10 μ M 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFH-DA), um composto não fluorescente que se difunde passivamente através das membranas biológicas. O H₂DCFH-DA é hidrolisado por esterases intracelulares a diclorodidrofluoreceína (DCF), um composto que após interação com ERO presentes no meio intracelular geram subprodutos fluorescentes. Desta forma, o conteúdo de ERO foi medida pela oxidação do DCF em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de emissão e de excitação de 525 nm e 450 nm, respectivamente.

4.4.8.3 *Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)*

Os valores de GSH foram determinados no lavado peritoneal e do homogenizado do coração, de acordo com o método de (ELLMAN, 1959). As amostras foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 2% e o sobrenadante, contendo a GSH, foi clareado por centrifugação a 7000 rpm por 5 min, em seguida adicionou o ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) com uma concentração de 0,47mM, culminando na formação do ácido 5-tio- 2-nitrobenzóico (TNB), que é proporcional a concentração de ácido tiol solúvel, principalmente a GSH. O experimento foi feito a 25°C e o valores de absorvância foram obtidos a $\lambda=412$ nm em espectrofotômetro contra um reagente branco. As concentrações nas suspensões de das amostras foram calculadas a partir de uma curva-padrão de absorção versus a concentração de GSH nas células, expressa em μ M/mL (BUKOWSKA; KOWALSKA, 2004).

4.4.8.4 *Determinação da peroxidação lipídica*

A peroxidação lipídica foi medida pela quantificação de malondealdeído (MDA) no soro, lavagem peritoneal e homogenato do fígado e coração, como indicador de estresse oxidativo, por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O procedimento técnico foi realizado de acordo com o protocolo proposto por (KOHN; LIVERSEDGE, 1944), adaptado por (PERCARIO; VITAL; JABLONKA, 1994).

Resumidamente, as lipoproteínas foram precipitadas pela adição de amostras a ácido tricloroacético 0,05 M (TCA) e ácido tiobarbitúrico a 0,67% (TBA; Sigma-Aldrich) em sulfato de sódio 2 M. A união do peróxido lipídico e do TBA foi realizada por aquecimento em banho-maria por 90 min. O cromógeno formado foi extraído em n-butanol, medido no comprimento de onda de 535 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em nanomoles de MDA por litro.

4.4.5 Avaliação dos parâmetros da coagulação

4.4.5.1 Hemograma

Os perfis hematológicos foram determinados por meio da realização de hemogramas. As determinações foram realizadas em contador hematológico de células semi-automático, HEMATOCLIN 2.8 VET, apropriado para mensuração de parâmetros hematológicos veterinários.

Desta forma, 50µL do sangue total acondicionado em microtubos de 1,5mL, previamente identificado contendo 5µL de EDTA. Os parâmetros que foram avaliados são: global de leucócitos, contagem de eritrócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) e número de plaquetas.

4.4.5.2 Contagem diferencial de leucócitos por microscopia ótica

Após a coleta de sangue total foi realizado o esfregaço sanguíneo para contagem diferencial de leucócitos, imediatamente após a punção cardíaca dos animais. Posteriormente as lâminas foram identificadas e coradas com o kit Panótico Rápido LB (Laborclin Ltda, BR) seguindo instruções do fabricante. A metodologia aplicada para a realização da contagem diferencial foi com auxílio de microscópio ótico no aumento de 1000x, contando-se 100 leucócitos por lâmina.

4.4.5.3 Determinação do Tempo de Protrombina (TP)

Para determinação do tempo de protrombina utilizou-se o kit produzido pela WAMA diagnóstica. O reagente TP foi mantido em banho maria à 37°C por 10 minutos. Em um tubo de plástico foi colocado 75µL de plasma e incubado em banho maria à 37°C por 1 minuto. Acrescentou-se 150µL do reagente e disparou-se o cronômetro para registrar o tempo de coagulação do plasma. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

4.4.5.4 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa)

Para determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada utilizou-se o kit produzido pela WAMA diagnóstica. O reagente 2 (R2) foi pré-incubado em banho maria à 37°C por no mínimo 10 minutos. Em um tubo de plástico foi colocado 75µL do plasma e incubado

por 3 minutos. Acrescentou-se 75µL do reagente 1 (R1) e incubou-se por mais 3 minutos. Adicionou-se 75µL do R2 e disparou-se o cronometro para registrar o tempo de coagulação do plasma. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

4.4.6 Determinação da isoenzima MB da Creatina Quinase (CK-MB)

A determinação de CK-MB foi realizada através de teste Cinético-UV com imunoinibição por Kit (Liquiform Labtest Diagnostica S.A). Os resultados foram expressos em U/L.

4.4.7 Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO)

As amostras foram coletadas 6 ou 24 horas após indução da sepse letal e sonicadas, posteriormente centrifugadas. O sobrenadante foi usado. Este ensaio de avaliação da atividade da MPO é feito pela reação de peroxidases do tecido com H₂O₂, usando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) como o substrato cromogênico. Em um poço acrescentou-se 70µl de solução de TMB (2,9 mM em dimetilsulfóxido; DMSO a 14,5%), 50 µl de H₂O₂ a 0,75 mM, 10 µl tampão de fosfato de sódio (150 mM a pH 5,4) e 20µl da amostra e incubado em banho maria a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente adicionou-se 10 µL de ácido sulfúrico 2 M. A solução foi lida no leitor de microplaca BioTek®, na absorbância de 450 nm para estimar a atividade de MPO.

4.4.8 Dosagem de citocinas

As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-17, TGF- β e IL-10 das amostras foram coletadas 24 horas após a CLP letal de acordo com o item 4.2.6 descrito anteriormente.

4.4.9 Determinação dos parâmetros bioquímicos

4.4.9.1. Determinação de AST/TGO, ALT/TGP

Para determinação da função hepática foi avaliada por meio dos parâmetros: AST/TGO, ALT/TGP. Foram coletados 200µL de sangue de cada animal em eppendorfs de 1,5mL, previamente identificados e centrifugados a 4.750g por 10 minutos a temperatura ambiente para obtenção do soro. Posteriormente, o soro foi rapidamente coletado e congelado a -70C e as amostras que apresentarem hemólise excessiva foram descartadas.

A metodologia aplicada e a reação utilizada em cada um dos testes poder ser visualizadas no quadro 03.

Quadro 03: Relação de analitos, metodologia aplicada, tipo de reação e comprimento de onda (reagentes Labtest).

ANALITO	METODOLOGIA	REAÇÃO	λ (nm)
ALT/TGP	Cinética UV-IFCC: ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato que é reduzido lactato. A diminuição da absorbância é proporcional à atividade da ALT na amostra.	Cinética comum decrescente	340nm
AST/TGO	Cinética UV-IFCC: AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato que é reduzido a malato. A diminuição da absorbância é proporcional à atividade da AST na amostra.	Cinética Continua Decrescente	340nm

Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

4.4.10 Análise estatística

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

5. RESULTADOS

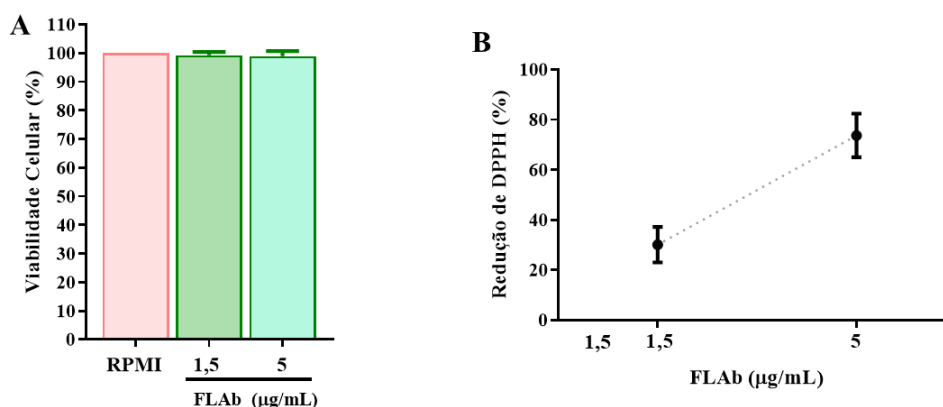
5.1 ATIVIDADE DA FLAb *in vitro*

5.1.1 Atividade anti-inflamatória e antioxidante da flab

Inicialmente *in vitro*, foi avaliado a viabilidade da linhagem de macrófagos RAW 264.7-Luc em diferentes concentrações da FLAb (1,25 e 5 $\mu\text{g/mL}$) e a capacidade antioxidante.

A Figura 16-A mostra que as concentrações de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ e de 5 $\mu\text{g/mL}$ de FLAb não induziram citotoxicidade na linhagem RAW-Luc *in vitro*, e apresentaram atividade antioxidante através do sequestro de radical livre pelo método DPPH (1,25 $\mu\text{g/mL}$ -30,10 \pm 7,09; 5 $\mu\text{g/mL}$ -73,74 \pm 8,72) (Figura 16-B).

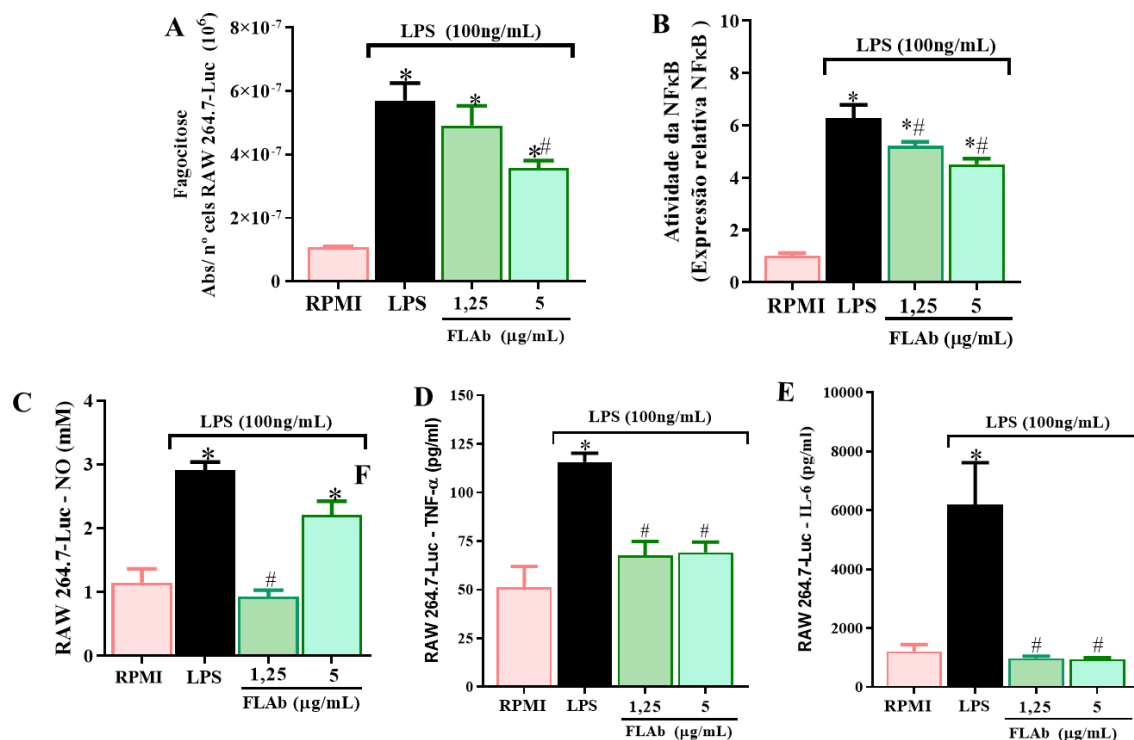
Figura 16. Avaliação da atividade da FLAb *in vitro*. (A) Avaliação da viabilidade celular em linhagem Raw-Luc (B) Ensaio da redução de DPPH pela FLAb. Os resultados representam a média \pm EPM. *p<0.05 tratamento (teste t de Student).



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Em seguida, avaliou-se a atividade fagocítica e anti-inflamatória FLAb (1,25 e 5 $\mu\text{g/mL}$) *in vitro*. Para isso, a linhagem celular Raw 264.7-Luc foram estimuladas com as concentrações de 1,25 e 5 $\mu\text{g/mL}$ da FLAb e 30 minutos após o estímulo foi adicionado 100 ng/mL de LPS. Os resultados demonstraram que a concentração de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ não alterou a capacidade fagocítica, no entanto, foi capaz de reduzir a expressão de NF- κ B e consequentemente a produção de mediadores pró-inflamatórios, NO, TNF- α e IL-6 (Figura 17-A, B, C, D e E). Em relação a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, observou-se que esta concentração também apresentou efeito anti-inflamatório com redução da capacidade fagocítica, no entanto não alterou os níveis de NO quando comparado ao controle LPS (LPS + FLAb- 5 $\mu\text{g/mL}$ vs LPS, p=0,0587) (Figura 17-C).

Figura 17. Avaliação da atividade fagocítica e anti-inflamatória da FLAb *in vitro*. (A) Capacidade Fagocítica (B) Atividade da NF- κ B (C) Níveis de óxido nítrico (D) Níveis de TNF- α (E) Níveis de IL-6. Para os Os resultados representam a média \pm EPM. * p <0.05 tratamento (LPS ou LPS + FLAb) *versus* grupo RPMI. # p <0.05 tratamento (LPS+FLAb) *versus* grupo LPS (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

5.2 ATIVIDADE DA FLAb em modelo de sepse murino letal

5.2.1 O tratamento com FLAb aumenta a sobrevida, reduz carga bacteriana e melhora parâmetros clínicos dos animais sépticos

A fim de estudar o efeito anti-inflamatório e antioxidante de FLAb no modelo de inflamação, os animais foram submetidos à sepse letal induzida por CLP e tratados com solução salina (CLP+Sal); ou 0,2 mg/Kg de FLAb isolada (CLP+FLAb); ou 30mg/Kg do antibiótico ertapenem (CLP+Ert) ou FLAb associada ao antibiótico ertapenem (CLP+F-Ert). Posteriormente foram observados parâmetros clínicos tais como sobrevida, severidade da sepse através do escore MSS, perda de peso corporal, consumo de água e ração durante 168 h.

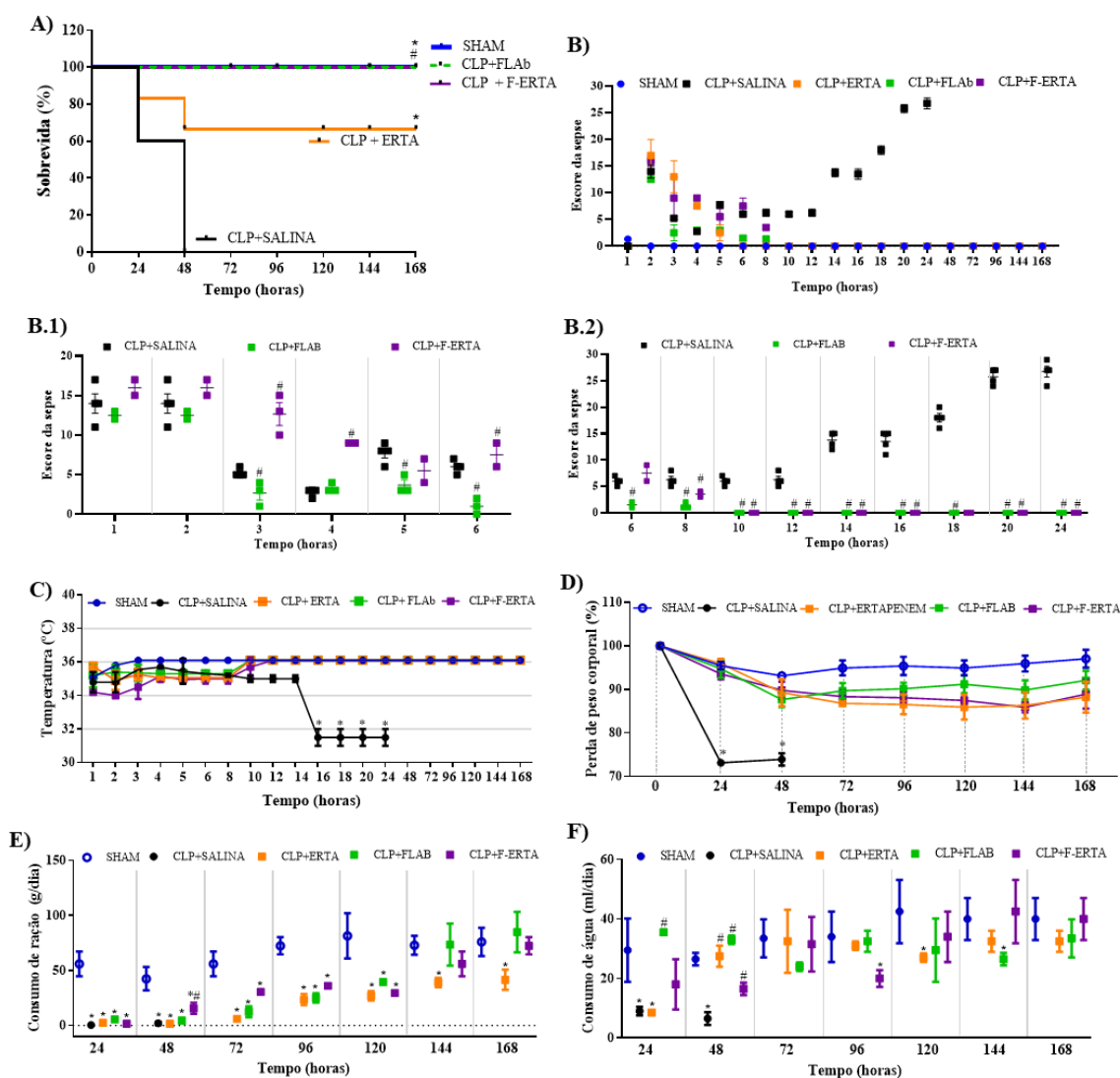
O grupo CLP+Sal foram à óbito dentro de 48 horas após a indução da sepse e durante este período os animais apresentaram piora do quadro clínico com elevado escore da severidade (Figura 18-A e B.1). No período entre 6 horas e 10 horas após a CLP, observou-se que o grupo CLP+Sal apresentou redução do movimento, olhos semicerrados e piloereção, o que pode caracterizar dor (AHWLA) (Figura 18-B.2). A partir das 10 horas até as 48 horas, o grupo

CLP+Sal não se mostrou ativo mesmo quando provocados com estímulos auditivos e não apresentou resposta ao toque, os olhos apresentaram secreção e não estavam abertos na maior parte do tempo, assim como apresentavam dificuldades ao respirar, com escores clínicos elevados e perda de peso (Figura 18-B.2 e D). Além disso, os animais CLP apresentaram hipotermia quando comparado aos grupos *sham*, confirmando desta forma a severidade do modelo utilizado neste estudo (Figura 18-C).

Os animais sépticos tratados somente com a FLAb apresentaram a taxa de sobrevivência de 100% e melhora significativa das alterações fisiológicas (Figura 18-B.1). Na figura 18-B.2 observa-se uma redução significativa dos escores a partir das oito horas após a CLP, o que significa que os animais estavam ativos, com a aparência e respiração normal, temperatura corporal normal (Figura 18-C), além de consumirem água e ração (Figura 18-E e F) dentro do esperado e consequente ganho de peso (Figura 18-D), mostrando um excelente prognóstico destes animais.

Em relação ao grupo CLP+Erta, os animais apresentaram a taxa de sobrevivência de 66,7% (Figura 18-A), sendo que os animais CLP+Erta que sobreviveram foram avaliados até o sétimo dia e apresentaram melhora das alterações fisiológicas (Figura 18- B.1), assim como aumentaram o seu consumo de água e ração 48 horas após a indução da CLP (Figura 18-E e F). Por outro lado, quando administrado ertapenem concomitantemente com a FLAb (grupo CLP+F-Erta) foi observado aumento da taxa de sobrevivência de 100% (Figura 18-A) com melhora dos parâmetros fisiológicos (Figura 18-E e F) semelhante ao grupo CLP+FLAb bem como obtiveram um excelente prognóstico.

Figura 18. Efeito da FLAb como terapia isolada ou adjuvante na taxa de sobrevivida (%) e nos parâmetros fisiológicos dos animais sépticos. Sobrevida de animais submetidos à CLP e tratados com salina (0,9%), FLAb (0,2mg/Kg/animal), F-ERTA (Flab:0,2mg/Kg/animal; Erta:30mg/Kg/animal) (A) Taxa de sobrevivida (%) (B) Escore total da sepse até 24 horas após CLP (B.1) Escore de 1 a 6 horas após CLP (B.2) Escore de 6 a 24 horas após CLP (C) Temperatura (D) Perda de peso corporal (%) (E) Consumo de ração (F) Consumo de água. O teste de sobrevivida foram expressos em porcentagem e avaliada pelo teste Log-Rank Mantel-Cox. A avaliação dos parâmetros clínicos foram representados através da média±EPM de n=5 animais. *p<0.05 tratamento (Ertapenem, FLAb ou FLAb com Ertapenem) versus grupo sham. #p<0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) versus grupo CLP-salina (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

5.2.2 O efeito do tratamento de flab isolado ou concomitante com ertapenem na cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP.

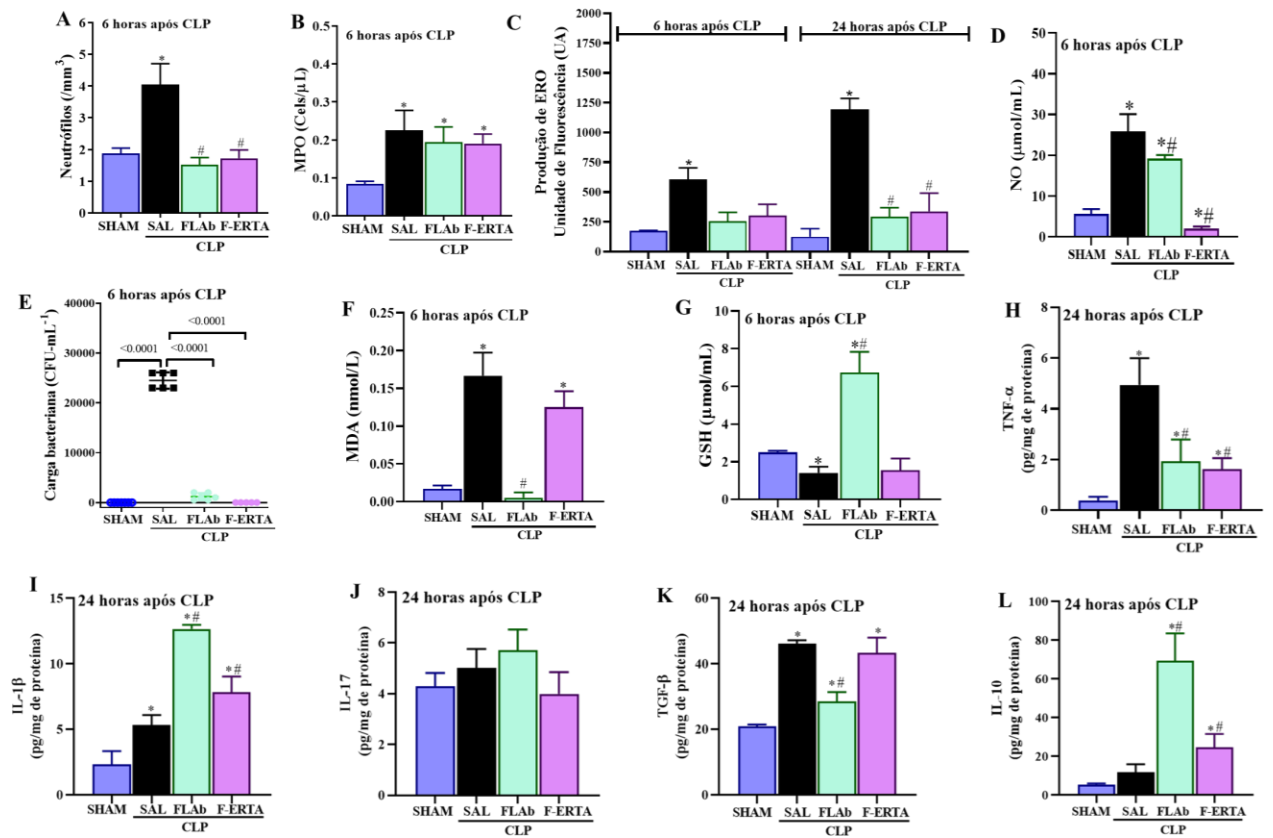
Na fase inicial da sepse, 6 horas após a indução, o grupo CLP+Sal apresentou aumento do recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal, bem como foi observado o aumento da enzima MPO comparado ao grupo Sham (Figura 19-A e B). Além disso, estes animais apresentaram aumento da produção de ERO e NO (Figura 19-C e D), elevada carga bacteriana,

com consequente dano oxidativo com aumento de MDA e diminuição de GSH (Figura 19-E e F). Em relação ao perfil de citocinas, o grupo CLP+Sal, apresentou aumento de TNF- α , IL-1 β e TGF- β (Figura 19-H, I e K) e redução da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 19-J).

O tratamento isolado com a FLAb nos animais CLP, manteve o recrutamento de neutrófilos e MPO (Figura 19- B), e foi observado menor produção de EROs e NO (Figura 19- C e D), com redução significativa da carga bacteriana na cavidade peritoneal (Figura 19-E) e consequentemente redução do dano celular, com diminuição de MDA e aumento de GSH (Figura 19-F e G). O tratamento com a FLAb também apresentou um perfil anti-inflamatório, com aumento dos níveis de IL-10 (Figura 18- L), e diminuição dos níveis de TNF- α e TGF- β comparado ao grupo CLP+Sal (Figura 19-F e H), embora tenha apresentado altos níveis de IL-1 β (Figura 19-I).

Ao avaliar o grupo CLP+F-ERTA, os animais apresentaram alguns resultados semelhantes ao grupo FLAb isolado, visto que mantiveram níveis de MPO, reduziu, ERO, NO, carga bacteriana e níveis de MDA na cavidade peritoneal (Figura 19-B-E), mas mantiveram os níveis de GSH semelhante ao grupo CLP tratado com salina. Em relação as citocinas, observou-se uma ação imunossupressora com aumento dos níveis de TGF- β e IL-10 (Figura 19-K e L), e redução dos níveis de TNF- α comparado ao grupo CLP+Sal (Figura 19-H). Em relação a citocina IL-1 β também foi observada aumento no grupo CLP+F-Erta após 24 horas da indução da sepse (Figura 19-I). Em todos os grupos não houve alteração nos níveis de IL-17 na cavidade peritoneal 24 horas após a CLP (Figura 19-J).

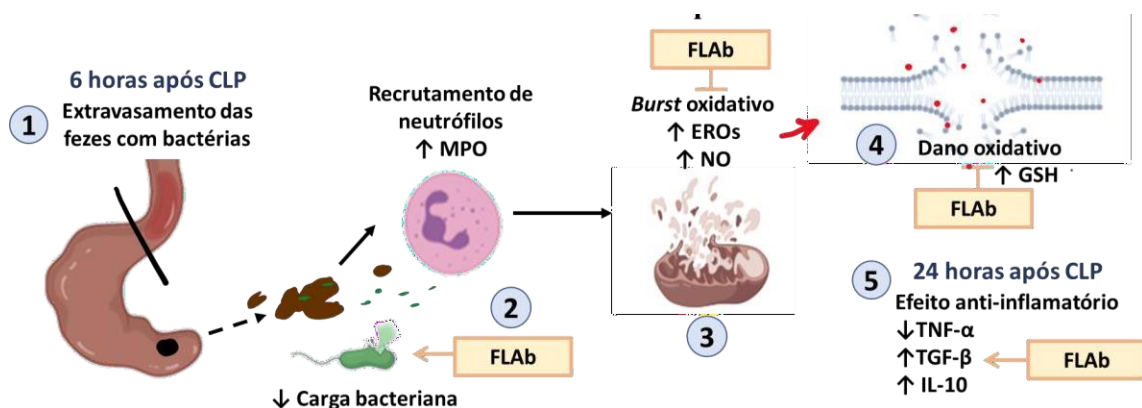
Figura 19: Efeito da FLAb na cavidade peritoneal em modelo de sepse letal. (A) Recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal do Sham e CLP-salina 6 horas após CLP (B) Níveis de MPO 6 horas após CLP (C) Geração de EROs 6 e 24 horas após CLP (D) Níveis de óxido nítrico 6 horas após CLP (E) Carga bacteriana na cavidade peritoneal 6 horas após CLP (F) Níveis de MDA 6 horas após CLP (G) Níveis de GSH 6 horas após CLP (H) Níveis de TNF- α 24 horas após CLP (I) Níveis de IL-1 β 24 horas após CLP (J) Níveis de IL-17 24 horas após CLP (K) Níveis de TGF- β 24 horas após CLP (L) Níveis de IL-10 24 horas após CLP. A avaliação dos parâmetros clínicos foram representados através da média \pm EPM de n=5 animais. *p<0.05 tratamento (Ertapenem, FLAb ou FLAb com Ertapenem) *versus* grupo sham. #p<0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) *versus* grupo CLP-salina (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Em resumo, a FLAb apresentou efeito anti-inflamatório, diminuiu o estresse oxidativo e protegeu do dano celular, mantendo o recrutamento de neutrófilos e os níveis de NO, reduzindo a carga bacteriana como mostrado na figura 20.

Figura 20: Resumo do efeito da FLAb na cavidade peritoneal em modelo de sepse letal. Efeito da FLAb na cavidade peritoneal em modelo de sepse letal. (1) 6 horas após CLP ocorre aumento da carga bacteriana (2) 6 horas após a CLP a FLAb manteve recrutamento de neutrófilos, MPO, além de reduzir a carga bacteriana (3) 6 horas após a CLP a FLAb evitou o *Burst* oxidativo com redução de ERO e aumento dos níveis de GSH (4) 6 horas após a CLP a FLAb protegeu os animais do dano oxidativo (5) 24 horas após a CLP é possível observar ainda o efeito anti-inflamatório da FLAb com a redução de TNF-α e aumento de TGF-β e IL-10.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

5.2.3 O efeito do tratamento de flab isolada ou concomitante com ertapenem na prevenção da disfunção na coagulação

O modelo de CLP é capaz de reproduzir alterações hemodinâmicas e imunológicas. As alterações no sistema hemostático durante a sepse, estão relacionadas a contagem global de leucócitos, eritrócitos e plaquetas (LIBERSKI; SZEWCZYK; KRZYCH, 2020). Nesse sentido, foi avaliado o hemograma dos camundongos submetidos à sepse e tratados com salina, ertapenem, FLAb isolada ou associada ao ertapenem, 6 e 24 horas após a indução da sepse (Tabela 02).

Tabela 02: Efeito da FLAb nos parâmetros hematológicos. Hemograma dos animais tratados com salina (0,9%), FLAb (0,2mg/Kg/mL/animal), F-ERTA (Flab:0,2mg/Kg/mL/animal; Erta:30mg/Kg/animal) 6, 24 horas após a indução da sepse. Os resultados representam a média±EPM. *p<0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) versus grupo CLP. #p<0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) vs grupo Ertapenem. (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).

HEMOGRAMA 6 HORAS				
PARÂMETROS	SHAM	CLP+SALINA	CLP+FLAb	CLP+F-ERTA
Hemácias (x10 ⁶ /uL)	6,9±1	5,7±0,58	5,90±0,09	5,37±0,66
Hemoglobina (g/dL)	10,35±3,32	9,3±1,13	9,2±1	8,35±1,2*
Hematócrito (%)	36,65±8,9	32,9±2,8*	32,95±0,21*	30,05±3,88
VCM (fL)	52,85±5,30	57,9±2,82*	55,95±0,49	56,1±0,28
HCM (pg)	14,8±2,7	16,25±0,35	15,55±0,5	15,5±0,28
CHCM (g/dL)	27,95±2,2	28,2±0,98	28,25±0,77	28,1±0,98
RDW (%)	17,125±2,01	13,75±0,91	15,5±1,37	15,8±1,13
Leucócitos (x10 ³ /uL)	5,9±2,54	3±1,69	4,6±3,11	6,35±0,63
Linfócitos (%)	61,2±26,02	67,75±20,39*	63,55±8,13	54,8±4,24*#
Monócitos (%)	5,15±1,20	6±3,5	5,45±1,48	6,15±0,5
Granulócitos (%)	33,65±24,81	26,8±16,85*	31±6,64	39,05±4,73

Tabela 02: Efeito da FLAb nos parâmetros hematológicos. Hemograma dos animais tratados com salina (0,9%), FLAb (0,2mg/Kg/mL/animal), F-ERTA (Flab:0,2mg/Kg/mL/animal; Erta:30mg/Kg/animal) 6, 24 horas após a indução da sepse. Os resultados representam a média±EPM. *p<0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) versus grupo CLP. #p<0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) vs grupo Ertapenem. (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).

(conclusão)

HEMOGRAMA 24 HORAS				
PARÂMETROS	SHAM	CLP+SALINA	CLP+FLAb	CLP+F-ERTA
Hemácias (x10 ⁶ /uL)	5,99 ± 1,824	2,68 ± 1*	5,1 ± 0,812 [#]	7,27 ± 1,173 [#]
Hemoglobina (g/dL)	9,8 ± 1,4	11,9 ± 0,7	7,5 ± 1,44	11,1 ± 1,69
Hematócrito (%)	35,32 ± 4,42	19,3 ± 1,41*	24,25 ± 0,21	39 ± 5,23 [#]
VCM (fL)	53,95 ± 1,48	59,46 ± 0,15*	53,16±1,79 [#]	52,26 ± 1,01 [#]
HCM (pg)	14,6 ± 0,28	34,16 ± 2,15*	14,63±0,55 [#]	14,86 ± 0,58 [#]
CHCM (g/dL)	27,15 ± 1,20	57,25 ± 3,75*	27,6 ± 0,23 [#]	28,53 ± 0,46 [#]
RDW (%)	18,25±1,02	29,58±9,52*	13,85±0,15	14,65±0,35
Leucócitos (x10 ³ /uL)	1,35 ± 0,49	10,92 ± 0,87*	4,4 ± 0,78 [#]	3,46 ± 0,64 [#]
Linfócitos (%)	50 ± 10,26	76,53 ± 1,17*	55,9 ± 4 [#]	56,2 ± 0,7 [#]
Monócitos (%)	4,3 ± 1,414	4 ± 0,45	5,1±0,81	4,4 ± 0,8
Granulócitos (%)	56,4 ± 8,06	16,46 ± 1,26*	54,25±0,21 [#]	57,675 ± 8,52 [#]

Legenda: CLP: ligadura e perfuração do ceco ; CHCM= Concentração de hemoglobina corpuscular média; ERTA: ertapenem; FLAB: fração lipídica de *A. brasiliensis*; F-ERTA: fração lipídica de *A. brasiliensis* + ertapenem;

HCM: Hemoglobina corpuscular média; RDW: Distribuição de glóbulos vermelhos; VCM: Volume corpuscular média.

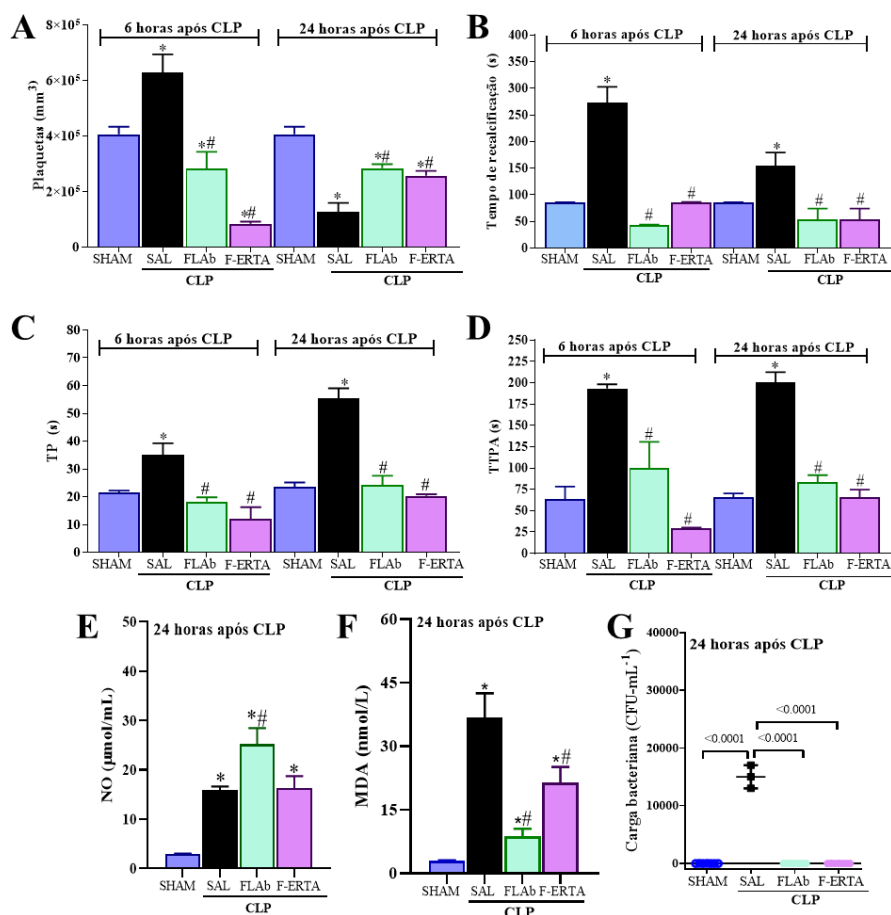
Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

O grupo CLP+Sal nas primeiras 6 horas apresentou alterações nos parâmetros do eritograma tais como anisocitose, baixa no número de eritrócitos, bem como redução da porcentagem do hematócrito, o que caracteriza anemia, no entanto, estas alterações foram mais significativas com 24 horas. O grupo CLP+FLAb apresentou baixo hematócrito nas primeiras 6 horas, mas recuperou dentro de 24 horas após a indução da sepse. Resultado semelhante foi observado no grupo CLP+F-Erta, em que os valores da hemoglobina e hematócrito foram recuperados dentro de 24 horas após CLP.

Em relação ao leucograma, no grupo CLP+Sal observou-se leucopenia com redução da porcentagem de granulócitos. Embora, com 24 após CLP o grupo tenha apresentado leucocitose, os animais ainda permaneceram com granulocitopenia, por outro lado a linfocitose foi acentuada nesse período. O grupo tratado com a FLAb isolada ou associada ao antibiótico ertapenem apresentaram melhora significativa no quadro séptico quando comparado ao grupo CLP+Sal como observado no leucograma na tabela 02.

Em relação aos parâmetros da coagulação, seis horas após a indução da sepse letal, o grupo CLP+Sal apresentou trombocitose (Figura 21-A), maior tempo de recalcificação, TP e TTPa, por outro lado 24 horas após a indução da CLP, os camundongos CLP+Sal apresentaram trombocitopenia (Figura 21-A), mas mantiveram aumento no tempo de recalcificação (Figura 21-B), no tempo de protrombina (Figura 21-C) e no tempo de tromplastina parcial ativada (Figura 21-D). Por outro lado, o tratamento dos grupos CLP+FLAb e CLP+F-Erta foi capaz de reverter as alterações dos parâmetros da coagulação (Figura 21-A, B, C e D).

Figura 21: Efeito da FLAb nos parâmetros da coagulação e do estresse oxidativo no modelo de sepse letal. (A) Contagem plaquetária 24h após CLP (B) Tempo de recalcificação 24h após CLP (C) TP 24h após CLP (D) TTPA 24h após CLP. (E) Níveis de óxido nítrico 24 horas após CLP (F) Carga bacteriana na cavidade peritoneal 24 horas após CLP (G) Níveis de MDA 24 horas após CLP. Os resultados representam a média±EPM. * $p < 0.05$ tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) *versus* grupo CLP. # $p < 0.05$ tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) vs grupo Ertapenem. (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).

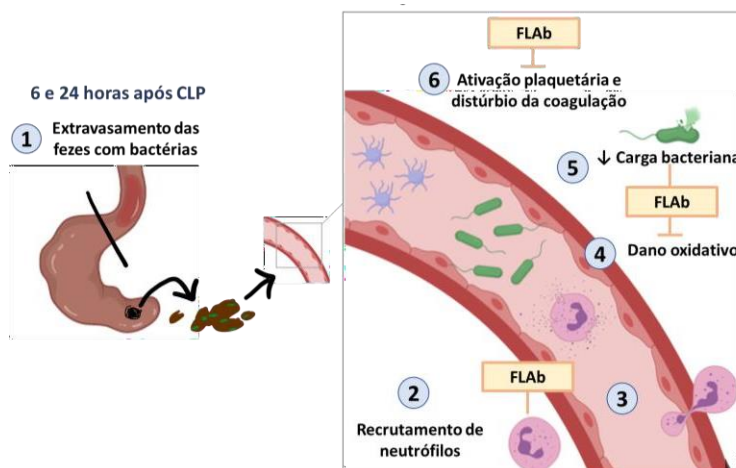


Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Nos parâmetros do estresse oxidativo, 24 horas após a indução da sepse letal o grupo CLP+Sal apresentou aumento dos níveis de NO, do dano oxidativo e da carga bacteriana no sangue. Enquanto o grupo CLP+FLAb embora tenha elevado os níveis de NO, apresentou redução do dano oxidativo, com diminuição de MDA, bem como eliminou a carga bacteriana (Figura 22- E, F e G). Quando a FLAb é associada ao antibiótico, os níveis de NO não tiveram alteração significativa, porém também houve redução do dano oxidativo bem como a eliminação da carga bacteriana sistêmica (Figura 22- E, F e G).

Em resumo, o tratamento com a FLAb protegeu os animais sépticos da disfunção microvascular através da atividade imunomoduladora, antimicrobiana, diminuiu o estresse oxidativo e protegeu do dano celular (Figura 23).

Figura 22: Resumo do efeito da FLAb nos parâmetros da coagulação e no estresse oxidativo. (1) 24 horas após CLP ocorre aumento da carga bacteriana **(2)** 24 horas após a CLP a FLAb normalizou o recrutamento de neutrófilos **(3)** 24 horas após a CLP a FLAb normalizou os parâmetros do hemograma **(4)** 24 horas após a CLP a FLAb protegeu os animais do dano oxidativo **(5)** eliminou a carga bacteriana no sistema circulatório **(6)** A FLAb protegeu os animais do distúrbio da coagulação.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

5.2.4 Avaliação do efeito do tratamento de flab isolada ou concomitante com ertapenem na disfunção dos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no fígado.

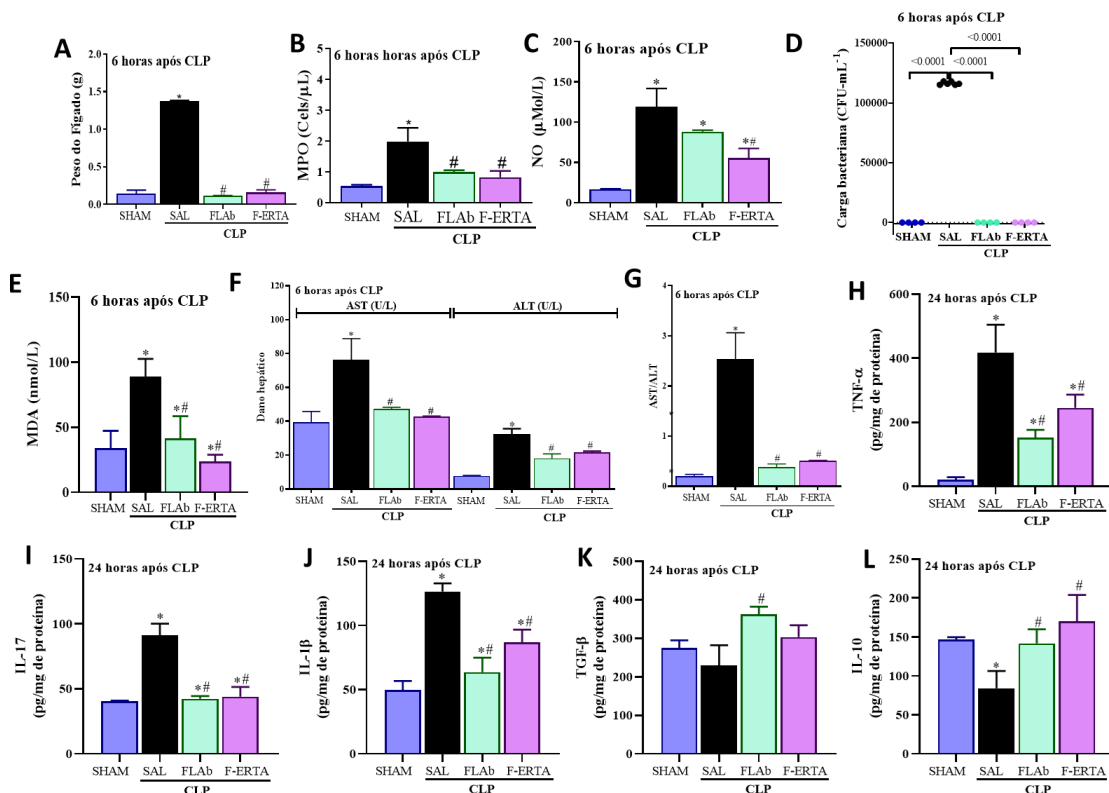
Em animais, é possível observar o dano hepático nas primeiras 6 horas após a indução da sepse a alterações bioquímicas como a elevação das transaminases é observada dentro das 15 horas após a CLP (YAN; LI; LI, 2014). Nesse sentido, foi avaliado o efeito do tratamento de FLAb no desenvolvimento da disfunção hepática seis horas após a indução da sepse nos animais.

Seis horas após a indução da sepse, na macroscopia o grupo CLP+sal aumento da massa total do fígado (Figura 23-A) aumento do recrutamento de neutrófilos, com aumento de MPO (Figura 23-B), dos níveis de óxido nítrico (Figura 23-C), da carga bacteriana (Figura 23-D), do dano tecidual com aumento de MDA (Figura 23-E). O dano hepático foi observado com as enzimas AST e ALT (Figura 23-F e G), em que seis horas após a CLP estavam elevadas comparadas ao grupo *sham*, sendo o índice AST/ALT do grupo CLP+Sal (2.53 ± 0.53) superior ao grupo *sham* (0.20 ± 0.03) caracterizando dano hepático. Por outro lado, a FLAb isolada ou associada ao ertapenem protegeu os animais sépticos da evolução para disfunção hepática (Figura 23-D-G), visto que levou a diminuição de todos os parâmetros avaliados incluindo o índice AST/ALT (CLP+FLAb= 0.38 ± 0.06 ; CLP+F-Erta= 0.50 ± 0.01) retornando aos níveis controles, semelhantes aos animais *Sham*.

As citocinas inflamatórias foram avaliadas 24 horas após a CLP, os animais CLP+Sal apresentaram níveis elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-17 (Figura 23-H, I e J) no tecido hepático

24 horas após a indução, enquanto os níveis de IL-10 estavam diminuídos e TGF- β não havia alteração quando comparado ao grupo *sham* (Figura 23-K). O tratamento com a FLAb apresentou um perfil anti-inflamatório, com redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-17 (Figura 23-H, I e J), e aumento dos níveis de IL-10 e TGF- β no fígado (Figura 23-K e L) comparado ao grupo CLP+Sal. Em relação ao grupo CLP+F-ERTA, os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-10 foram semelhantes a terapia isolada com FLAb (Figura 23-H, I, J e L), no entanto, os níveis de TGF- β não tiveram alteração significativa no fígado quando comparado ao grupo CLP+Sal (Figura 23-K).

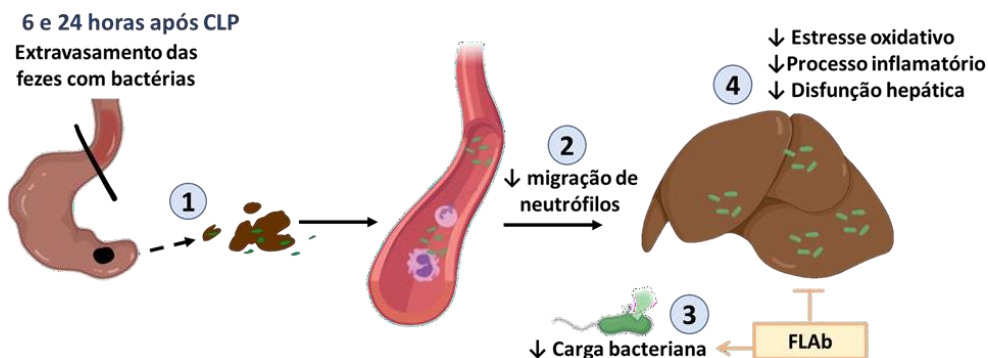
Figura 23. Efeito da FLAb nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no fígado. (A) peso do fígado (g) (B) Níveis de MPO no fígado (C) Níveis de óxido nítrico no fígado (D) Carga bacteriana no fígado (E) Níveis de MDA no fígado (F) Níveis de AST e ALT 6 horas após CLP (G) Razão AST/ALT (H) Níveis de TNF- α 24 horas após CLP (I) Níveis de IL-1 β 24 horas após CLP (J) Níveis de IL-17 24 horas após CLP (K) Níveis de TGF- β 24 horas após CLP (L) Níveis de IL-10 24 horas após CLP. Os resultados representam a média \pm EPM. * p <0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) *versus* grupo CLP. # p <0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) vs grupo Ertapenem. (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Na Figura 24 mostra em resumo que o tratamento com a FLAb em modelo de sepse letal apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, reduz o estresse oxidativo, protege os animais do dano celular bem como da disfunção hepática.

Figura 24. Resumo do efeito da FLAb nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no fígado. Efeito da FLAb na disfunção hepática (1) 6 e 24 horas após CLP ocorre aumento da carga bacteriana (2) 6 horas após a CLP a FLAb reduz o recrutamento de neutrófilos (3) 24 horas após a CLP a FLAb reduz a carga bacteriana (4) 6 e 24 horas após a CLP a FLAb protegeu os animais do dano oxidativo, do processo inflamatório e da disfunção hepática.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

5.2.5 Avaliação do efeito do tratamento de flab isolada ou concomitante com ertapenem nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no coração

A resposta inflamatória exacerbada associada a disfunção endotelial vascular resulta no aumento do infiltrado de neutrófilos nos cardiomiócitos e aumento de agregados plaquetas-leucócitos no coração. Em consequência o paciente séptico desenvolve disfunção cardíaca (LIU et al., 2017). Nesse sentido, neste estudo foi avaliado dano cardíaco através dos níveis de MDA e CK-MB e o perfil imunológico e do estresse oxidativo após a indução de CLP.

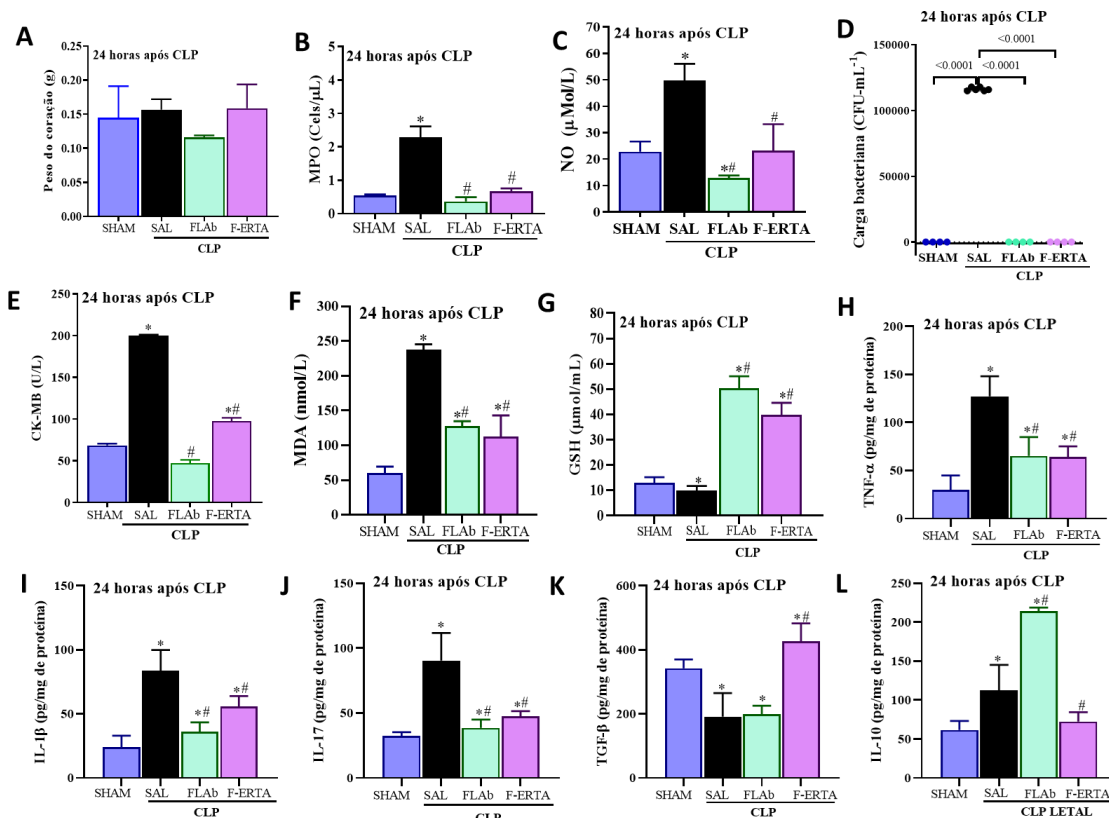
Dentro de 24 horas após CLP não foi observado alteração significativa na massa total do coração dos animais tratados com FLAb comparados ao grupo CLP-salina (Figura 25-A). No entanto, os animais apresentaram aumento da migração de neutrófilos, com aumento de MPO, associado a elevada carga bacteriana 24 horas após a indução de sepse (Figura 25-B e D). Em relação aos parâmetros do estresse oxidativo, o grupo CLP+sal apresentou aumento do estresse oxidativo com elevado níveis de NO (Figura 25-C) e MDA (Figura 21-F). Além disso, os níveis da enzima CK-MB, que correspondem ao dano cardíaco estavam elevados 24 horas após a indução da sepse (Figura 25-E).

Por outro lado, o tratamento com a FLAb protegeu os animais do dano cardíaco através da redução dos níveis de MPO, NO, MDA e CK-MB (Figura 25- B, C e E), assim como eliminou a carga bacteriana (Figura 25-D), e aumentou da enzima antioxidante GSH (Figura 25-G).

Os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-17 (Figura 25-I, J e K) do grupo CLP+Sal no tecido cardíaco 24 horas após a indução estavam elevados enquanto os níveis de TGF- β diminuiu e IL-10 não alterou em relação aos animais *Sham* (Figura 25-K e L). O tratamento

com a FLAb apresentou um perfil anti-inflamatório, com redução dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-17 (Figura 25-H, I e J) comparado ao grupo CLP-salina, e aumento dos níveis de IL-10 (Figura 25-N), mas não TGF- β . Em relação ao grupo CLP+F-ERTA, os níveis das citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-17) foram semelhantes a terapia isolada com FLAb (Figura 25-H, I e J), no entanto, os níveis de TGF- β foram maiores que o grupo CLP+FLAb (Figura 25-K), enquanto que os níveis de IL-10 reduziram (Figura 25-L).

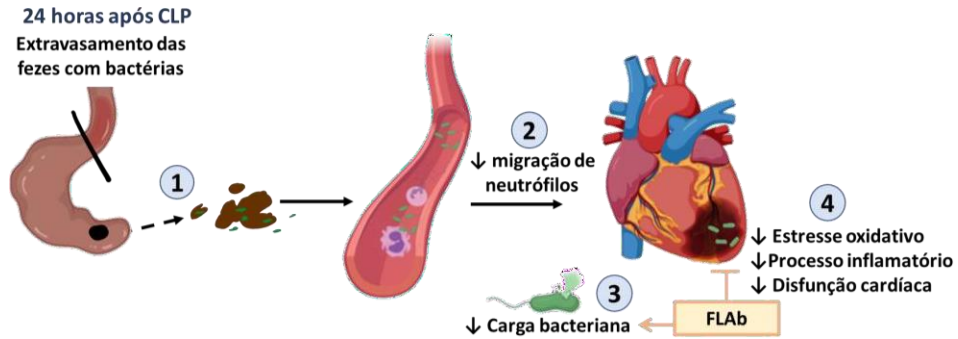
Figura 25. Efeito da FLAb de flab isolada ou concomitante com ertapenem nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no coração. (A) peso do coração (g) (B) Níveis de MPO no coração (C) Níveis de óxido nítrico no coração (D) Carga bacteriana no coração (E) Níveis de CK-MB (F) Níveis de MDA no coração (G) Níveis de GSH (H) Níveis de TNF- α 24 horas após CLP (I) Níveis de IL-1 β 24 horas após CLP (J) Níveis de IL-17 24 horas após CLP (K) Níveis de TGF- β 24 horas após CLP (L) Níveis de IL-10 24 horas após CLP Os resultados representam a média \pm EPM. * p <0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) *versus* grupo CLP. # p <0.05 tratamento (FLAb ou FLAb com Ertapenem) vs grupo Ertapenem. (two-way ANOVA seguida pelo pós teste de Boferroni).



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Na Figura 26 mostra em resumo que o tratamento com a FLAb em modelo de sepse letal apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, reduz o estresse oxidativo, protege os animais do dano celular bem como da disfunção cardíaca.

Figura 26. Resumo do efeito da FLAb de flab isolada ou concomitante com ertapenem nos parâmetros bioquímicos e do estresse oxidativo no coração. (1) 24 horas após CLP ocorre aumento da carga bacteriana (2) 24 horas após a CLP a FLAb normalizou o recrutamento de neutrófilos (3) 24 horas após a CLP a FLAb normalizou os parâmetros do hemograma (4) 24 horas após a CLP a FLAb protege os animais do dano oxidativo, reduziu o processo inflamatório e evitou o dano cardíaco.



Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado o efeito anti-inflamatório e antioxidante da FLAb *in vitro*, através da inibição da atividade da NF- κ B bem como da redução de mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-6 e NO. Em modelo de sepse letal induzida por CLP em murinos, o tratamento com FLAb protegeu os animais sépticos da disfunção orgânica, levando a homeostase dos parâmetros da coagulação e do estresse oxidativo evitando o desenvolvimento dos danos microvascular, cardíaco e hepático, assim como reduziu a carga bacteriana, melhorou os parâmetros clínicos tais como a aparência, responsividade, temperatura e peso corporal, o que ocasionou o aumento da sobrevivência.

Frações lipídicas obtidas do cogumelo *Agaricus* são ricas em esteróis tais como ergosterol, agarol e peróxido de ergosterol. No entanto, o cultivo de cogumelos em diversos substratos podem modificar o conteúdo de ergosterol como mostrado anteriormente por nossos colaboradores em que avaliaram o conteúdo de esteróis totais ($\mu\text{g} / \text{g}$) obtido do micélio de *A.brasiliensis* ($6,23 \pm 0,66$) cultivado em substrato convencional e quando obtida através da fermentação da erva-mate com *A.brasiliensis* ($21,32 \pm 3,74$) (dados não publicados). Em nosso estudo, a fração lipídica foi obtida a partir do micélio de *A.brasiliensis* cultivado em *I.paraguariensis* e posteriormente foi avaliado o seu efeito *in vitro* e em modelo de sepse letal em murinos.

Diversos estudos mostram que o ergosterol extraído de nutracêuticos tais como a *Monascus anka* (YONGXIA et al., 2020), *Agaricus bisporus* (GIL-RAMÍREZ et al., 2014), *Calocybe indica* (RATHORE et al., 2020) e *Agaricus blazei* (CORRÊA et al., 2018a) apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticolesterolêmica e anticarcinogênica. De acordo com Medina; Iuga; Trigos, (2016) o efeito antioxidante de esteróis como o ergosterol, se dá pela capacidade deste reagir com radicais livres tais como $\bullet\text{OOH}$ e $\bullet\text{OCCH}_3$ e provavelmente com radicais alquil-peroxil. Além disso, de acordo com a literatura os esteróis provenientes de cogumelos e plantas (os chamados fitoesteróis) tem capacidade modular a resposta imune e o estresse oxidativo nos processos inflamatórios através da inibição da via NF- κ B/p65 (HUAN et al., 2017; KOBORI et al., 2007). *In vitro*, a esses dados corroboram com nossos resultados, o tratamento com 1,5 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da FLAb foi capaz de inibir a atividade da NF- κ B *in vitro* mesmo com a adição do estímulo de LPS.

A via NF- κ B é responsável pela proliferação celular, produção citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-6, quimiocinas, e na resposta ao estresse oxidativo, a qual tem um importante papel no desenvolvimento da disfunção orgânica da sepse (MUSSBACHER

et al., 2019). De acordo com Xu et al., (2018), o ergosterol inibe a via de sinalização NF- κ B/p65 através do aumento da expressão do fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2) (XU et al., 2018). O Nrf-2 regula negativamente a via de sinalização NF- κ B através da redução dos níveis de ROS intracelular e inibe a degradação do proteossomal κ B- α assim como a translocação nuclear do NF- κ B (SAHA et al., 2020). Além disso, o Nrf-2 aumenta a expressão da enzima Hemeoxigenase-1 (HO-1), a qual tem papel crucial na inflamação protegendo do estresse oxidativo e dano celular (VIJAYAN; WAGENER; IMMENSCHUH, 2018).

Desta forma, considerando a capacidade da FLAb inibir a via NF- κ B, com redução dos mediadores pró-inflamatórios (NO, TNF- α e IL-6) *in vitro*, foi avaliado o efeito do tratamento com a FLAb isolada ou concomitante com ertapenem em modelo de sepse letal. O modelo de ligadura e perfuração cecal pode levar a peritonite grave e MOD. A peritonite induzida por CLP replica fatores e complexidade da fisiopatologia inflamatória da sepse humana induzida pela interação patógenos e hospedeiro (SJAASTAD et al., 2020). Nesse sentido o modelo CLP é considerado padrão ouro no estudo no desenvolvimento de novas terapias eficazes para sepse (GONG; WEN, 2019).

Em modelo de sepse letal, o tratamento com a FLAb foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais sépticos. Além disso, os animais que receberam a FLAb isolada ou associada ao antibiótico apresentaram melhor prognóstico quando comparada aos animais que receberam apenas o ertapenem. Sabe-se que o aumento da sobrevivência na sepse e do excelente prognóstico dos animais assim como em humanos está intimamente relacionado com a redução da carga bacteriana, redução do estresse oxidativo e regulação do sistema imune (OPOTA; JATON; GREUB, 2015). Nesse sentido, estudos mostram que terapia antimicrobiana tem o papel central no aumento da sobrevivência dos pacientes, em que sua administração tardia leva ao aumento da taxa da mortalidade em 2% a cada hora dos pacientes na UTI (FERRER et al., 2014; MARTÍNEZ et al., 2020).

Embora o ertapenem, um carbapenêmico, tem-se mostrado eficaz na redução da mortalidade por infecções comparado aos demais antibióticos da mesma classe (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ et al., 2016), a terapia antimicrobiana por si só pode não ser efetiva, como já foi discutido anteriormente por Halbach et al., (2017). Os autores avaliaram o efeito do antibiótico imipenem (25mg/Kg de peso corporal) em diferentes protocolos de tempo (1h antes, 3 e 6h após a indução da sepse letal, bem como 4, 24 e 48h após a CLP) e não foi observado diferença significativa na sobrevivência. Posteriormente observaram que mesmo sem a presença de bactérias os animais vinham a óbito comprovando que apenas o uso de antibiótico não é eficaz no

aumento da sobrevida e controle da sepse devido a componentes bacterianos que ativam a resposta inflamatória (HALBACH et al., 2017).

Os parâmetros clínicos permite avaliar o prognóstico dos pacientes com sepse, para isso em humanos é utilizado o APACHE 2 (*Acute Physiology and Chronical Health Evaluation*), SAPS II (*Simplified Acute Physiology*) e SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*). O uso de protocolos que indiquem o prognóstico do paciente está intimamente relacionada com a taxa de mortalidade destes pacientes. Jee et al., (2020), avaliaram as taxas de mortalidade de pacientes que tiveram o diagnóstico precoce da sepse (admitidos dentro de uma hora no departamento de emergência) e os pacientes que tiveram diagnóstico tardio (os demais) através do uso de SOFA e APACHE II. Os autores reportaram que os pacientes que foram diagnosticados precocemente apresentaram mortalidade significativamente menor em comparação com os pacientes que foram diagnosticados tardiamente.

Em animais sépticos o índice de prognóstico é realizado através de M-CASS (*mouse clinical assessment score for sepsis*) ou MSS (*murine sepsis score*) (SHRUM et al., 2014). No presente estudo os animais submetidos à CLP letal e tratados com FLAb apresentaram redução dos escores do MSS. Após três horas da CLP os animais não apresentavam piloereção (que pode caracterizar dor), encontravam-se ativos com a atividade ligeiramente suprimida, com os olhos abertos, respiração ligeiramente reduzida. Embora os animais que foram tratados com CLP associado ao antibiótico ertapenem apresentaram redução dos escores significativamente após seis horas da indução da sepse, estes animais apresentaram melhora do quadro clínico com aumento de sobrevida. Nesse contexto, considerando o índice de prognóstico dos animais sépticos associado a literatura foi definido o tempo de 6 e 24 horas após a indução da sepse para avaliar o efeito da FLAb isolada ou associada ao antibiótico ertapenem no desenvolvimento da sepse através de parâmetros do estresse oxidativo, bioquímico e imunológico.

A indução de sepse por CLP consiste no rompimento da barreira intestinal levando a difusão persistente da microbiota intestinal na cavidade peritoneal com entrada de microorganismo na corrente sanguínea, que ocasiona alterações imunológicas, hemodinâmicas e metabólicas e a falência múltipla de órgãos observada na sepse (KAKIHANA et al., 2016; LI et al., 2018). Nesse sentido, inicialmente foi avaliado o efeito da FLAb isolada ou associada a antibioticoterapia no primeiro sítio inflamatório após a indução da sepse, a cavidade peritoneal.

Nas primeiras 6 horas após a CLP, a administração da FLAb via intraperitoneal mostrou efeito antimicrobiano na cavidade abdominal. Anteriormente Corrêa et al., (2018), mostrou que extrato de *Agaricus* rico em ergosterol possui excelente atividade bacteriostática frente à bactérias gram-negativas e gram-positivas que podem ser encontradas no trato gastrointestinal

de camundongos e em humanos, entre estas a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. Outra hipótese mostrada na literatura é que o ergosterol tem a capacidade de aumentar o efeito antimicrobiano de antibióticos como aminoglicosídeos, tornando-os mais eficaz. Acredita-se que o ergosterol pode alterar a membrana das bactérias potencializando a captação do antibiótico (ANDRADE et al., 2018)

Ainda no estágio inicial da sepse, o aumento da carga bacteriana e seus produtos na cavidade peritoneal irão ativar células do sistema imune como os monócitos e aumentar o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. Os neutrófilos a fim dos contribuirão com a eliminação do patógeno, liberam o conteúdo dos grânulos incluindo a MPO a qual sintetiza ácido hipocloroso e outros oxidantes reativos são importantes na defesa do hospedeiro e está associado com o *clearance* bacteriano (SCHRIJVER et al., 2017).

No entanto, a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios na sepse resulta no estado pró-oxidante com desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos, como a GSH, o que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, que irão inibir as funções fisiológicas inclusive podendo resultar na morte celular como observado anteriormente em nosso estudo em modelo de sepse em murinos (DE SOUZA GOMES et al., 2018; PRAUCHNER, 2017).

Na cavidade peritoneal a FLAb reduziu a geração de ROS e protegeu do dano tecidual. Recentemente, Dupont et al., (2021) propuseram quatro mecanismo dos esteróis na atividade antioxidante na prevenção de peroxidação lipídica: i. devido a transferência de átomo de hidrogênio do estero para o radical livre; ii. a transferência de elétrons do estero para o radical livre; iii. transferência de elétrons seguida da transferência de prótons para o radical livre e por fim iv. a formação de um aduto radical, o qual consiste na ligação de um radical com um estero fornecendo estabilidade ao radical.

Além da atividade antioxidante a FLAb apresentou atividade imunomoduladora 24 horas após a indução da sepse através da redução dos níveis de TNF- α e TGF- β em contrapartida aumentou os níveis de IL-1 β e IL-10. No estágio inicial da sepse o paciente apresenta uma resposta inflamatória exacerbada e posteriormente supressão imunológica. O aumento de TGF- β na sepse tardia está associado ao aumento da mortalidade, redução da depuração bacteriana e aumento da lesão tecidual (ZHOU et al., 2020), logo a redução do níveis de TGF- β 24 horas após a indução da sepse pode caracterizar um bom prognóstico dos animais sépticos tratados com a FLAb.

Em relação a citocina IL-1 β , estudos mostram que o aumento de IL-1 β na fase tardia da sepse estimula a proliferação, migração e diferenciação de células da medula óssea revertendo a paralisia imunológica da sepse (GUO et al., 2021). Enquanto o aumento de IL-10 promove a expansão de células Treg. De acordo com Nascimento et al., (2017) pacientes que sobrevivem à sepse apresentam aumento de IL-33 que induz a diferenciação de macrófagos do tipo M2 e estes são secretores de IL-10. O mesmo é observado em modelo de sepse letal em murinos.

Durante processo inflamatório da sepse, a alteração da morfologia dos eritrócitos modifica a afinidade da hemoglobina pela molécula de oxigênio (SIMCHON; JAN; CHIEN, 1987). O aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio compromete o transporte de oxigênio para os tecidos e aumenta a conversão de oxigênio em EROs (BATEMAN et al., 2017). Além disso, *in vivo* (por volta de 6 horas após a indução) é possível observar a diminuição da deformabilidade dos eritrócitos, perdem a capacidade de liberar vasodilatadores e se agregam facilmente o que contribui para o desenvolvimento da disfunção microvascular. Em humanos é possível observar dentro de 24 horas após a admissão de pacientes críticos (BATEMAN et al., 2017; HUA et al., 2018). A deformabilidade de eritrócitos é observada por meio da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), e tem sido associada como biomarcador de inflamação crônica e na sepse e tem mostrado relação direta com aumento da mortalidade dos pacientes que dão entrada na UTI (KIM et al., 2013; MAHMOOD et al., 2014).

No estágio inicial da sepse além das alterações dos eritrócitos ocorre degradação do glicocálice das células endoteliais o que resulta no comprometimento da barreira endotelial causando aumento da permeabilidade endotelial com extravasamento de fluidos e células e consequentemente compromete a perfusão microcirculatória (BEURSKENS et al., 2020). Um estudo realizado por Vardon Bounes et al., (2018), mostraram que dentro de oito horas após a indução da sepse por CLP a contagem global de leucócitos diminuiu significativamente sendo que a neutropenia foi observada nas primeiras quatro horas após a indução da sepse, assim como a contagem de plaquetas que reduziu progressivamente após 24 horas.

O modelo CLP letal reproduz alterações que caracterizam um fenótipo pró-inflamatório das células endoteliais vasculares como aumento da expressão de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), redução da expressão de VE-caderina e ZO-1, responsáveis pela permeabilidade do tecido endotelial. Além disso, o modelo CLP apresenta alterações na ativação e agregação plaquetária na sepse, através do aumento da expressão de p-selectina 24 horas persistindo até 48 horas após CLP, o que caracteriza aumento da ativação plaquetária, com formação de imunotrombos desde as primeiras quatro horas na

microcirculação em diferentes órgãos resultando na disfunção microvascular (BRASS, 2010; LIVERANI et al. 2017).

Recentemente, Zhong et al., (2021) mostraram que em modelo de sepse em murinos ocorre hiperatividade do receptor $P2Y_{12}$, um receptor central na ativação plaquetária. A ativação deste receptor por nucleotídeos como a ADP nas plaquetas, contribui com a geração de trombina, aumenta a expressão do fator tecidual e a expressão de p-selectina que promove a agregação plaquetas-leucócitos e amplificação da cascata de coagulação (LI; ZHANG; CAO, 2021). A ativação das plaquetas por $P2Y_{12}$ leva aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas e ligante CD40 solúvel (sCD40L) o que aumenta o recrutamento e agregados com leucócitos em especial neutrófilos. Com isso, os neutrófilos produzem ERO e liberam NETs levando a disfunção endotelial (MANSOUR et al., 2020).

No presente estudo, foi observado que o tratamento com a FLAb isolada ou associada a antibioticoterapia, normalizou os parâmetros da coagulação e preveniu a trombocitopenia grave. Além disso, o tratamento com a FLAb protegeu do dano endotelial por peroxidação lipídica embora os níveis de NO estivessem elevados. De acordo com Feng, Hou, Cheng (2017), o ergosterol é capaz de inibir a ativação e agregação plaquetária. Os autores testaram *in vitro* frente à quatro tipos de indutores plaquetários (ácido araquidônico, trombina, colágeno e adenosina difosfato) e o ergosterol inibiu a ativação dos receptores AMPc e $P2Y_{12}$. Nesse contexto, acredita-se que a FLAb tem atividade antimicrobiana eficaz através da ativação de leucócitos sem levar o dano endotelial, evitando desta forma o desequilíbrio da coagulação.

A disfunção endotelial também é observada na microvasculatura hepática. Estudos apontam que a translocação de endotoxinas e patógenos da circulação sistêmica para o sistema porta-hepático são reconhecidos pelos hepatócitos desencadeando o processo inflamatório com aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β além de ERO e NO. O aumento de TNF- α ativa neutrófilos e aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais sinusoidais (YAO; WANG; YIN, 2014). No estágio inicial da sepse induzida por neutrófilos recrutados secretam enzimas proteolíticas e ERO o que resulta em dano nas células endoteliais sinusoidais e hepatócitos em consequência, é possível observar diminuição do fluxo sanguíneo hepático e dano mitocondrial (HUANG et al., 2020). O dano nos hepatócitos pode observado através das enzimas transaminases ALT, AST e a sua razão (EL-NAHHAL; AL_SHAREEF, 2018; ZHAO et al., 2020).

Em nosso estudo, foi observado o aumento do infiltrado de neutrófilos e edema das células hepáticas foi observado no grupo CLP+Sal através do aumento da massa hepática e dos níveis de MPO seis horas após a indução da CLP. Sabe-se que a MPO é derivada de ERO e

tem como principal atividade eliminar bactérias durante a sepse. No entanto, estudos apontam que níveis elevados de MPO está associado a disfunção orgânica devido aumento do estresse oxidativo associado com anormalidades metabólicas como a geração de lipoproteínas o que aumenta o risco de trombose e em células endoteliais leva a expressão de FT amplificando o processo inflamatório sistêmico (NDREPEPA, 2019).

Por outro lado, o grupo CLP+FLAb e CLP+F-erta, não desenvolveu uma resposta inflamatória exacerbada e conseqüentemente dano hepático, este fato foi observado através da redução de ALT, AST e MDA bem como apresentaram perfil anti-inflamatório. O mecanismo protetor do ergosterol no desenvolvimento da disfunção hepática pode ser justificado através do aumento do fator de transcrição Nrf2 (XIE et al., 2020). Um estudo realizado por Li et al., (2021) mostrou que a deficiência de Nrf2 em camundongos sépticos apresentaram dano hepático com elevados níveis de ALT, AST e MDA, além do aumento de citocina pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β).

Ainda de acordo Tai et al., (2016) outro mecanismo protetor hepático do ergosterol é através da regulação positiva do Receptor Gamma ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ). Estruturalmente os PPARs são semelhantes aos receptores de esteróides sendo ativados por ergosterol. A ativação PPAR γ regula negativamente citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-1 β , IL-6, MCP-1 e MIP-1 β e diminui a ativação de TLR-4. Além disso, PPAR γ polariza os macrófagos em fenótipo M2 com perfil anti-inflamatório (MONROY-RAMIREZ et al., 2021).

Os PPARs também são altamente expressos em cardiomiócitos. A ativação dos PPAR γ tem mostrado efeito protetor nos cardiomiócitos através da regulação positiva da proteína antiapoptótica Bcl-2 e inibição de NF- κ B (CHANDRA; MIRIYALA; PANCHATCHARAM, 2017). Recentemente, Xie et al., (2020), avaliou o estresse oxidativo no dano miocárdico induzido por Isoproterenol. Os autores mostraram que o tratamento de ergosterol com diferentes doses 5mg/Kg, 25mg/Kg e 50mg/Kg diminuiu a expressão de Bax, citocromo c, caspase-3, caspase 9, PARP, e aumentou os níveis de Bcl-2, Nrf2 e HO-1. Além disso, mostraram que as doses de ergosterol foram capazes reduzir os níveis das enzimas marcadoras de disfunção cardíaca como o CK-MB em modelo de rato, além disso reduziu MDA e aumentou os níveis de SOD comprovando o efeito cardioprotetor do ergosterol.

O estresse oxidativo na disfunção orgânica como já discutido anteriormente, contribui com a piora da progressão da sepse (WINKLER et al., 2017). Espécies reativas tais como o NO tem um papel fundamental na regulação do tônus vascular e na manutenção da integridade endotelial, no entanto em excesso está envolvido no dano tecidual, disfunção endotelial,

alteração da pressão arterial (ZHANG, 2017). Nesse contexto, o aumento de NO e citocinas pró-inflamatórias por cardiomiócitos e pelo infiltrado de células do sistema imune no coração regulam negativamente os receptores β -adrenérgicos levando a depressão miocárdica das vias de sinalização pós-receptor. Além disso, níveis elevados destes mediadores levam a disfunção na permeabilidade mitocondrial e alteram os níveis de Ca^{2+} intracelular e consequentemente causam disfunção contrátil dos cardiomiócitos dos pacientes sépticos (KAKIHANA et al., 2016; POVEDA-JARAMILLO, 2021).

No presente estudo, os animais tratados com FLAb isolada ou associada ao ertapenem apresentaram redução de NO, de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) aumento das anti-inflamatória (IL-10) quando administrado somente FLAb e aumento de TGF- β quando administrado concomitantemente com ertapenem evitando desta forma o desenvolvimento do dano cardíaco.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo mostramos que a Fração lipídica de *A.brasiliensis* cultivado em *I.paraguariensis* em diferentes concentrações (1,25 e 5 µg/mL) apresenta atividade antioxidante através do sequestro de radicais *in vitro* e não causa citotoxicidade em linhagem de macrófagos RAW 264.7-Luc. Além disso, a FLAb manteve a capacidade fagocítica, diminuiu os níveis de NO na menor concentração, reduziu a atividade do fator de transcrição NF-κB e conseqüentemente as citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6, mostrando efeito imunomodulador.

Em modelo de sepse letal induzida por CLP em murinos, os animais sépticos tiveram diminuição da sobrevivência e piora nos parâmetros clínicos tais como a aparência, responsividade, temperatura e peso corporal. Por outro lado, o tratamento com 0,2mg/Kg de FLAb e o tratamento com 0,2mg/Kg de FLAb associado ao antibiótico ertapenem (30mg/Kg) manteve os animais vivos durante o período avaliado bem como foi observado a melhora nos parâmetros clínicos. O tratamento dos animais sépticos com a FLAb somente assim como quando associado ao ertapenem levou a homeostase dos parâmetros da coagulação e do estresse oxidativo evitando o desenvolvimento da disfunção microvascular. Além disso, protegeu os animais do desenvolvimento da disfunção orgânica, reduzindo a carga bacteriana, estresse oxidativo bem como evitou o dano hepático e cardíaco.

Nesse sentido, o presente estudo mostrou que o uso da FLAb como tratamento, assim como adjuvante à antibioticoterapia na sepse se mostrou promissor devido a sua atividade antioxidante, antimicrobiana e imunomoduladora.

REFERÊNCIA

ANDRADE, J. C. et al. Cholecalciferol, Ergosterol, and Cholesterol Enhance the Antibiotic Activity of Drugs. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 88, n. 5–6, p. 244–250, 1 dez. 2018.

ASIM, M.; AMIN, F.; EL-MENYAR, A. Multiple organ dysfunction syndrome: Contemporary insights on the clinicopathological spectrum. **Qatar medical journal**, v. 2020, n. 1, p. 22, 2020.

BATEMAN, R. M. et al. The Effect of Sepsis on the Erythrocyte. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, set. 2017.

BERNARDSHAW, S. et al. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill protects against lethal septicemia in a mouse model of fecal peritonitis. **Shock**, v. 25, n. 4, p. 420–425, abr. 2006.

BEURSKENS, D. M. et al. Decreased endothelial glycocalyx thickness is an early predictor of mortality in sepsis. **Anaesthesia and intensive care**, v. 48, n. 3, p. 221–228, maio 2020.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**, v. 152, n. 1, p. 73–84, 2004.

BURZYNSKI, L. C. et al. The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 α by Thrombin. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 1033- 1042.e6, 2019.

CARABALLO, C.; JAIMES, F. Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 92, n. 4, p. 629–640, dez. 2019.

CHANDRA, M.; MIRIYALA, S.; PANCHATCHARAM, M. PPAR γ and Its Role in Cardiovascular Diseases. **PPAR research**, v. 2017, p. 6404638, 2017.

CHENG, M.-X. et al. [Inhibitory Effects of *Agaricus Blazei* Murrill (FA-2-b- β) on Proliferation of Chronic Myeloid Leukemia Cells in vivo and Its Mechanism]. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, v. 28, n. 6, p. 1885–1891, dez. 2020.

COHEN, C. T.; TURNER, N. A.; MOAKE, J. L. Production and control of coagulation proteins for factor X activation in human endothelial cells and fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2005, 2020.

CORRÊA, R. C. G. et al. A natural food ingredient based on ergosterol: Optimization of the extraction from: *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in yogurts. **Food and Function**, v. 9, n. 3, p. 1465–1474, 2018a.

CORRÊA, R. C. G. et al. A natural food ingredient based on ergosterol: Optimization of the extraction from: *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in yogurts. **Food and Function**, v. 9, n. 3, p. 1465–1474, 2018b.

D'ACAMPORA, J. A.; LOCKS, F. G. DE. Median lethal needle caliber in two models of experimental sepsis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2014.

DA SILVA, DE S. A. C. et al. *Agaricus blazei* bioactive compounds and their effects on human health: benefits and controversies. **Current pharmaceutical design**, p. 1–28, 2017.

DA SILVA CAMPELO, M. et al. Polysaccharides and extracts from *Agaricus brasiliensis* Murill - A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 183, p. 1697–1714, jul. 2021.

DAIBER, A. et al. Oxidative stress and inflammation contribute to traffic noise-induced vascular and cerebral dysfunction via uncoupling of nitric oxide synthases. **Redox Biology**, v. 34, p. 101506, 2020.

DE OLIVEIRA, F. M. et al. Photoacoustic spectroscopy applied to the direct detection of bioactive compounds in *Agaricus brasiliensis* mycelium. **Journal of biological physics**, v. 44, n. 1, p. 93–100, mar. 2018.

DE SOUZA GOMES, R. et al. Salivary Gland Extract from *Aedes aegypti* Improves Survival in Murine Polymicrobial Sepsis through Oxidative Mechanisms. **Cells**, v. 7, n. 11, p. 182, 2018.

DOLIN, H. H. et al. Characterization of Pathogenic Sepsis Etiologies and Patient Profiles: A Novel Approach to Triage and Treatment. **Microbiology insights**, v. 12, p. 1178636118825081, 2019.

DUPONT, S. et al. Antioxidant Properties of Ergosterol and Its Role in Yeast Resistance to Oxidation. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 7, p. 1024, 25 jun. 2021.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.

EL-NAHHAL, Y.; AL_SHAREEF, A. Effective biomarkers for successful management of sepsis. **Trends in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 1–8, 2018.

FERRER, R. et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. **Critical care medicine**, v. 42, n. 8, p. 1749–1755, ago. 2014.

GAŞECKA, M. et al. Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 2, p. 259–268, 2018.

GIL-RAMÍREZ, A. et al. Effect of ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 589–597, 2014.

GONG, W.; WEN, H. Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1960, p. 249–255, 2019.

GRACIA-SANCHO, J. et al. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 411–431, 2021.

GUO, H. et al. Interleukin-1 β Protection Against Experimental Sepsis in Mice. **Inflammation**, v. 44, n. 1, p. 358–370, 2021.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, B. et al. Ertapenem for the treatment of bloodstream infections due to ESBL-producing Enterobacteriaceae: a multinational pre-registered cohort study. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1672–1680, jun. 2016.

GYAWALI, B.; RAMAKRISHNA, K.; DHAMOON, A. S. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. **SAGE open medicine**, v. 7, p. 2050312119835043, 2019.

HABIMANA, R. et al. Sepsis-induced cardiac dysfunction: a review of pathophysiology. **Acute and critical care**, v. 35, n. 2, p. 57–66, maio 2020.

HALBACH, J. L. et al. Why antibiotic treatment is not enough for sepsis resolution: An evaluation in an experimental animal model. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 12, 2017.

HUA, T. et al. Micro- and Macrocirculatory Changes During Sepsis and Septic Shock in a Rat Model. **Shock**, v. 49, n. 5, 2018.

HUAN, W. et al. Effects of Ergosterol on COPD in Mice via JAK3/STAT3/NF- κ B Pathway. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 884–893, 2017.

HUANG, M.; CAI, S.; SU, J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 21, p. 5376, 29 out. 2019.

HUANG, Y. et al. HMGB1 mediates acute liver injury in sepsis through pyroptosis of liver macrophages. **International journal of burns and trauma**, v. 10, n. 3, p. 60–67, 2020.

ILAS. Implementação de protocolo gerenciado de sepse. Protocolo clínico. Atendimento ao paciente adulto com sepse/ choque séptico. p. 1–14, 2017.

INCE, C.; DE BACKER, D.; MAYEUX, P. R. Microvascular Dysfunction in the Critically Ill. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 2, p. 323–331, 1 abr. 2020.

JEE, W. et al. Mortality difference between early-identified sepsis and late-identified sepsis. **Clinical and experimental emergency medicine**, v. 7, n. 3, p. 150–160, set. 2020.

JOFFRE, J. et al. Endothelial Responses in Sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 3, p. 361–370, 26 fev. 2020.

JOFFRE, J.; HELLMAN, J. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Sepsis and Acute Inflammation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 35, n. 15, p. 1291–1307, 26 fev. 2021.

JOURDE-CHICHE, N. et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 2, p. 87–108, 2019.

KAKIHANA, Y. et al. Sepsis-induced myocardial dysfunction: Pathophysiology and management. **Journal of Intensive Care**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2016.

KALACĚ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 209–218, 2013.

KERRIS, E. W. J. et al. Platelets and platelet extracellular vesicles in hemostasis and sepsis. **Journal of Investigative Medicine**, v. 68, n. 4, p. 813–820, 2020.

KIM, C. H. et al. An increase in red blood cell distribution width from baseline predicts mortality in patients with severe sepsis or septic shock. **Critical care (London, England)**, v. 17, n. 6, p. R282, dez. 2013.

KIM, T. S.; CHOI, D. H. Liver Dysfunction in Sepsis. **The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi**, v. 75, n. 4, p. 182–187, abr. 2020.

KOBORI, M. et al. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 209–219, 2007.

KOHN, H.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Experimen Ther.* 1944;82:292 – 300. v. 82, p. 292–300, 1944.

LI, J. L. et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 6, p. 2410–2422, 2018.

LI, L. et al. Protective effects of Nrf2 against sepsis-induced hepatic injury. **Life Sciences**, v. 282, p. 119807, 2021.

LI, X.; ZHANG, G.; CAO, X. The Function and Regulation of Platelet P2Y12 Receptor. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, 2021.

LIBERSKI, P. S.; SZEWCZYK, M.; KRZYCH, Ł. J. Haemogram-Derived Indices for Screening and Prognostication in Critically Ill Septic Shock Patients: A Case-Control Study. **Diagnostics**, v. 10, n. 9, p. 3–11, 2020.

LIMA, C. U. J. O.; GRIS, E. F.; KARNIKOWSKI, M. G. O. **Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review** *Revista Brasileira de Farmacognosia* Sociedade Brasileira de Farmacognosia, , nov. 2016.

LIU, Y.-C. et al. Sepsis-Induced Cardiomyopathy: Mechanisms and Treatments. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1021, 2017.

MAHMOOD, N. A. et al. Broadening of the red blood cell distribution width is associated with increased severity of illness in patients with sepsis. **International journal of critical illness and injury science**, v. 4, n. 4, p. 278–282, 2014.

MAI, S. H. C. et al. Body temperature and mouse scoring systems as surrogate markers of death in cecal ligation and puncture sepsis. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 6, n. 1, p. 20, 2018.

MANSOUR, A. et al. P2Y(12) Inhibition beyond Thrombosis: Effects on Inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, fev. 2020.

MANTZARLIS, K.; TSOLAKI, V.; ZAKYNTHINOS, E. Review Article Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. v. 2017, 2017.

MARTÍNEZ, M. L. et al. An approach to antibiotic treatment in patients with sepsis. **Journal of Thoracic Disease**, v. 12, n. 3, p. 1007–1021, 2020.

MEDINA, M. E.; IUGA, C.; TRIGOS, Á. Mechanism and kinetics of the oxidative damage to ergosterol induced by peroxy radicals in lipid media: A theoretical quantum chemistry study. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 196–203, 2016.

MEHTA, S.; GILL, S. E. **Improving clinical outcomes in sepsis and multiple organ dysfunction through precision medicine.** **Journal of thoracic disease**, jan. 2019.

MISGIATI, M. et al. Ergosterol isolated from *Agaricus blazei* Murill n-hexane extracts as potential anticancer MCF-7 activity. **Pharmacognosy Journal**, v. 13, n. 2, p. 418–426, 2021.

MIZUNO, M.; NISHITANI, Y. Isoflavone intake inhibits the development of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) induced mammary tumors in normal and ovariectomized rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 31–38, 2014.

MOKOCHINSKI, J. B. et al. Biomass and sterol production from vegetal substrate fermentation using *agaricus brasiliensis*. **Journal of Food Quality**, v. 38, n. 3, p. 221–229, 2015.

MONROY-RAMIREZ, H. C. et al. PPARs as Metabolic Sensors and Therapeutic Targets in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, 2021.

MORENO, R. P.; NASSAR, A. P. Is APACHE II a useful tool for clinical research? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 264–267, 2017.

MOURÃO, F. et al. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 197–202, 2011a.

MOURÃO, F. et al. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 197–202, 2011b.

MUSSBACHER, M. et al. Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 85, 2019.

NASCIMENTO, D. C. et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14919, 2017.

NAVEGANTES, K. C. et al. *Agaricus brasiliensis* mycelium and its polysaccharide modulate the parameters of innate and adaptive immunity. **Food and Agricultural Immunology**, v. 24, n. 4, p. 393–408, 2013.

NAVEGANTES-LIMA, K. C. et al. *Agaricus brasiliensis* Mushroom Protects Against Sepsis by Alleviating Oxidative and Inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. July, 2020a.

NAVEGANTES-LIMA, K. C. et al. *Agaricus brasiliensis* Mushroom Protects Against Sepsis by Alleviating Oxidative and Inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. July, 2020b.

NDREPEPA, G. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 493, p. 36–51, 2019.

OPOTA, O.; JATON, K.; GREUB, G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 4, p. 323–331, 2015.

PAPI, S.; AHMADIZAR, F.; HASANVAND, A. The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress. **Immunopathol Persa**, v. 5, n. 1, p. e08–e08, 2019.

PERCARIO, S.; VITAL, A.; JABLONKA, F. Dosagem do malondialdeído. **NewsLab**, p. 46–50, 1994.

PETERS VAN TON, A. M. et al. Precision Immunotherapy for Sepsis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1926, 2018.

PONTES-ARRUDA, A.; ARAGÃO, A. M. A.; ALBUQUERQUE, J. D. Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, γ -linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 9, p. 2325–2333, 2006.

POVEDA-JARAMILLO, R. Heart Dysfunction in Sepsis. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 35, n. 1, p. 298–309, 2021.

PRAUCHNER, C. A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, v. 43, n. 3, p. 471–485, maio 2017.

PU, W. et al. Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 109552, 2020.

RATHORE, H. et al. Vitamin D(2) fortification of *Calocybe indica* mushroom by natural and artificial UVB radiations and their potential effects on nutraceutical properties. **3 Biotech**, v. 10, n. 2, p. 41, fev. 2020.

RAVIKUMAR, N. et al. Septic Cardiomyopathy: From Basics to Management Choices. **Current problems in cardiology**, v. 46, n. 4, p. 100767, abr. 2021.

ROMÁN-HIDALGO, C. et al. Selective, rapid and simultaneous determination of ergosterol and ergocalciferol in mushrooms by UPLC-Q-TOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 194, p. 113748, 2021.

RUBEL, R. et al. Immunomodulatory and Antitumoral Properties of *Ganoderma lucidum* and *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes) Medicinal Mushrooms. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 20, n. 4, p. 393–403, 2018.

RUDD, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, 18 jan. 2020.

RUIZ-MIYAZAWA, K. W. et al. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-biological interactions**, v. 237, p. 9–17, jul. 2015.

SAHA, S. et al. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 22, p. 1–31, 2020.

SAIKI, P. et al. The anti-inflammatory effect of: *Agaricus brasiliensis* is partly due to its linoleic acid content. **Food and Function**, v. 8, n. 11, p. 4150–4158, 2017.

SANTA, H. S. D. et al. Dietary Polysaccharides Dietary polysaccharides and Immune Modulation. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. (Eds.). . **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 1–24.

SARAF, A. et al. Functional and molecular effects of TNF- α on human iPSC-derived cardiomyocytes. **Stem Cell Research**, v. 52, p. 102218, 2021.

SCHRIJVER, I. T. et al. Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. **Intensive care medicine experimental**, v. 5, n. 1, p. 43, set. 2017.

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. 762–774, 2016.

SHI, J.-H.; SUN, S.-C. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1849, 2018.

SHRUM, B. et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

SILVIS, M. J. M. et al. Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 3135, 2020.

SIMCHON, S.; JAN, K. M.; CHIEN, S. Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 253, n. 4, 1987.

SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.

SJAASTAD, F. V et al. Inducing Experimental Polymicrobial Sepsis by Cecal Ligation and Puncture. **Current protocols in immunology**, v. 131, n. 1, p. e110, dez. 2020.

SOVRANI, V. et al. In Vitro and In Vivo Antitumoral Activity of Exobiopolymers from the Royal Sun Culinary-Medicinal Mushroom *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 19, n. 9, p. 767–775, 2017.

TAI, C.-J. et al. The anti-hepatic fibrosis activity of ergosterol depended on upregulation of PPARgamma in HSC-T6 cells. **Food & function**, v. 7, n. 4, p. 1915–1923, abr. 2016.

TAKATANI, Y. et al. Inducible nitric oxide synthase during the late phase of sepsis is associated with hypothermia and immune cell migration. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 98, n. 5, p. 629–639, maio 2018.

TIPOE, T. L. et al. Plasminogen Activator Inhibitor 1 for Predicting Sepsis Severity and Mortality Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1218, 2018.

VANNUCCI, L. et al. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 2, p. 357–364, 2013.

VARDON BOUNES, F. et al. Platelet activation and prothrombotic properties in a mouse model of peritoneal sepsis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 13536, set. 2018.

VIJAYAN, V.; WAGENER, F. A. D. T. G.; IMMENSCHUH, S. The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, p. 159–167, 2018.

VIRÁG, M. et al. Individualized Hemodynamic Management in Sepsis. **Journal of personalized medicine**, v. 11, n. 2, fev. 2021.

WANG, Y. et al. Platelet activation and antiplatelet therapy in sepsis: A narrative review. **Thrombosis Research**, v. 166, n. January, p. 28–36, 2018.

WEISS, S. L. et al. **Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children**. [s.l: s.n.]. v. 46

WINKLER, M. S. et al. Markers of nitric oxide are associated with sepsis severity: An observational study. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2017.

WOŹNICA, E. A. et al. Liver dysfunction in sepsis. **Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University**, v. 27, n. 4, p. 547–551, abr. 2018.

- XIE, Q. et al. Ergosterol Attenuates Isoproterenol-Induced Myocardial Cardiotoxicity. **Cardiovascular toxicology**, v. 20, n. 5, p. 500–506, out. 2020.
- XU, H.; QI, Q.; YAN, X. Myricetin ameliorates sepsis-associated acute lung injury in a murine sepsis model. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 394, n. 1, p. 165–175, jan. 2021.
- XU, J. et al. Ergosterol Attenuates LPS-Induced Myocardial Injury by Modulating Oxidative Stress and Apoptosis in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 583–592, 2018.
- YAN, J.; LI, S.; LI, S. The role of the liver in sepsis. **International reviews of immunology**, v. 33, n. 6, p. 498–510, 2014.
- YANG, S. et al. Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 784, 2018.
- YAO, Y.; WANG, D.; YIN, Y. Advances in sepsis-associated liver dysfunction. **Burns & Trauma**, v. 2, n. 3, p. 97, 2014.
- YONGXIA, Z. et al. Isolation and characterization of ergosterol from *Monascus anka* for anti-lipid peroxidation properties. **Journal de mycologie medicale**, v. 30, n. 4, p. 101038, dez. 2020.
- ZHANG, Y. H. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 742, 2017.
- ZHAO, P. et al. Aspartate transaminase/alanine transaminase ratio as a significant prognostic factor in patients with sepsis: a retrospective analysis. p. 1–19, 2020.
- ZHONG, H. et al. NOD2-mediated P2Y12 upregulation increases platelet activation and thrombosis in sepsis. **Biochemical Pharmacology**, v. 194, p. 114822, 2021.
- ZHOU, G. et al. Ascorbate protects against vascular leakage in cecal ligation and puncture-induced septic peritonitis. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 4, p. 409–416, 2012.

ZHOU, M. et al. Correction of immunosuppression in aged septic rats by human ghrelin and growth hormone through the vagus nerve-dependent inhibition of TGF- β production. **Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, p. 71, 2020.

ZIESMANN, M. T.; MARSHALL, J. C. Multiple Organ Dysfunction: The Defining Syndrome of Sepsis. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 184–190, 23 jan. 2018.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado do comitê de ética



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO LIPÍDICA EXTRAÍDA DE *Agaricus brasiliensis* NA DISFUNÇÃO MICROVASCULAR E HEPÁTICA EM MODELO DE SEPSIS MURINO.", protocolada sob o CEUA nº 8355050418 (10/000000), 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 24/05/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF LIPID FRACTION EXTRACTED FROM *Agaricus brasiliensis* IN MICROVASCULAR AND HEPATIC DYSFUNCTION IN MURINE MODEL OF SEPSIS", utilizing 66 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 8355050418 (10/000000), 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 05/24/2018.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa*

Vigência da Proposta: de *06/2018* a *06/2020*

Área: *Neurociências*

Origem: *Biotério Central ICB/UFPA*

Espécie: *Camundongos heterogênicos*

sexo: *Machos e Fêmeas*

idade: *30 a 90 dias*

N: *66*

Linhagem: *Swiss*

Peso: *20 a 30 g*

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Ensaios In vitro, Imunologia e Microbiologia - LABEIM - UFPA.

Belé, 09 de julho de 2018

M^a Viviana B. Monteiro

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa Joia de Mello

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará