

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS - IFSULDEMINAS**

CARLOS ROBERTO PEREIRA

**EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE AMOREIRA (*Morus nigra* L.) NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO CARDIOVASCULAR E NA RESISTÊNCIA
INSULÍNICA DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

**Machado/MG
2020**

CARLOS ROBERTO PEREIRA

**EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE AMOREIRA (*Morus nigra* L.) NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO CARDIOVASCULAR E NA RESISTÊNCIA
INSULÍNICA DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia

**Machado/MG
2020**

P49e

Pereira, Carlos Roberto

Efeito do extrato das folhas de amoreira (*Morus Nigra* L.) no processo inflamatório cardiovascular e na resistência insulínica de camundongos dislipidêmicos / Carlos Roberto Pereira. -- Machado: [s.n.], 2020.

71 p.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia

1. Aterosclerose. 2. Dislipidemia. 3. Prevenção. I Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado. II. Título.

CARLOS ROBERTO PEREIRA

**EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE AMOREIRA (*Morus nigra* L.) NO
PROCESSO INFLAMATÓRIO CARDIOVASCULAR E NA RESISTÊNCIA
INSULÍNICA DE CAMUNDONGOS DISLIPIDÊMICOS**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 24 de Julho de 2020



Prof. Dra. Brígida Monteiro Vilas Boas
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Sul de Minas Gerais –
Campus Machado


Prof. Dra. Erika Kristina Incerpi Garcia
Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL - MG


Prof. Dr. José Antonio Dias Garcia
IFSULDEMINAS

Honro o fechamento deste ciclo dedicando, a minha dissertação, ao mundo, por sempre mudar as coisas, por nunca fazê-las da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar; o que descobrir e o que fazer, pois através disto consegui concluir a minha dissertação. Dedico ainda a todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado compartilhando sua experiência de forma construtiva. Gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela sabedoria, resiliência e perspicácia que me foi dado.

Agradeço à minha família pelo apoio, amor, carinho e atenção, por sempre terem sido fonte de determinação e inspiração. Sem eles nada disso seria possível.

Ao professor Dr. José Antônio Dias Garcia, que sempre acreditou e confiou em meu trabalho, sendo uma pessoa sem igual, que serve para muitos como exemplo de amor ao trabalho, dedicação e sabedoria.

Gostaria de agradecer a todos meus amigos e colegas que contribuíram para evolução e desenvolvimento do projeto.

Gostaria de agradecer também a todos os professores e professoras que contribuíram direta e indiretamente na realização deste projeto.

À UNIFENAS, por todo apoio com suas dependências e recursos tecnológicos.

Ao IFSULDEMINAS que me proporcionou a oportunidade de expansão de meus horizontes.

E por fim, a todos aqueles que me ajudaram minimamente, até mesmo com uma palavra positiva, de confiança e carinho.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”.

Carl Sagan

RESUMO

As doenças cardiovasculares resultam em grandes custos e impactos na sociedade e são a principal causa de morte no mundo. As dislipidemias, o diabetes mellitus tipo 2, a resistência insulínica e o processo inflamatório cardiovascular são considerados os principais agentes envolvidos nas implicações que elevam os índices de morbimortalidade cardiovascular. As folhas de *Morus nigra* L. possuem altas concentrações de metabólitos secundários, principalmente de fenólicos totais e flavonoides, que podem desempenhar importantes funções biológicas. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do extrato das folhas da amoreira na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e na hipertrofia ventricular esquerda de camundongos dislipidêmicos. Para tal, foram utilizados para realização dos ensaios, 80 camundongos knockout para o gene receptor de LDL, que foram divididos em quatro grupos experimentais (n=20), sendo: grupo S, alimentados com dieta padrão; grupo SA, alimentados com dieta padrão e extrato das folhas da amoreira; grupo HL, alimentados com dieta hiperlipídica e grupo HLA, alimentados com dieta hiperlipídica e extrato das folhas da amoreira. Após 15 dias de tratamento, o sangue foi coletado para quantificação dos níveis plasmáticos de colesterol total e suas frações, triglicerídeos, proteína C reativa, insulina, glicose e calculado o índice de Homa. Foram coletados tecidos cardíacos e da parede da aorta para avaliação histológica e quantificação da expressão do CD40L. Os animais tratados com o extrato das folhas de amoreira apresentaram elevação do HDL plasmático, redução moderada da hipercolesterolemia, mas não apresentaram redução da hipertrigliceridemia. Nos camundongos do grupo HLA, o extrato das folhas da amoreira preveniu a resistência à insulina e, conseqüentemente a hiperinsulinemia, reduziu a expressão dos níveis plasmáticos de PCR, assim como preveniu o aumento da expressão cardíaca e vascular do CD40L. O tratamento com o extrato das folhas de amoreira preveniu a inflamação cardiovascular com diminuição da resistência insulínica e da dislipidemia severa reduzindo desta forma, o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda.

Palavras chave: Dislipidemia. Aterosclerose. Inflamação. Fitoterápicos. Prevenção.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases result in high costs and impacts on society and are the leading cause of death in the world. Dyslipidemias, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance and the cardiovascular inflammatory process are considered the main agents involved in the implications that raise cardiovascular morbidity and mortality rates. The leaves of *Morus nigra* L. have high concentrations of secondary metabolites, mainly of phenolic totals and flavonoids, which can perform important biological functions. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of mulberry leaf extract on cardiovascular inflammation, insulin resistance and left ventricular hypertrophy in dyslipidemic mice. To this end, 80 mice were used to carry out the assays, knockout for the LDL receptor gene, which were divided into four experimental groups (n=20), being: group S, fed with standard diet; SA group, fed with standard diet and mulberry leaf extract; HL group, fed with hyperlipidic diet and HLA group, fed with hyperlipidic diet and mulberry leaf extract. After 15 days of treatment, blood was collected to quantify plasma levels of total cholesterol and its fractions, triglycerides, C-reactive protein, insulin, glucose and Homa index calculated. Cardiac and aortic wall tissues were collected for histological evaluation and quantification of CD40L expression. The animals treated with mulberry leaf extract presented elevated plasma HDL, moderate reduction of hypercholesterolemia, but did not present reduction of hypertriglyceridemia. In mice in the HLA group, mulberry leaf extract prevented insulin resistance and, so, hyperinsulinemia reduced the expression of plasma PCR levels as well as prevented increased cardiac and vascular expression of CD40L. Treatment with mulberry leaf extract prevented cardiovascular inflammation with decreased insulin resistance and severe dyslipidemia thus reducing the development of left ventricular hypertrophy.

Keywords: Dyslipidemia. Atherosclerosis. Inflammation. Phytotherapy. Prevention.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	09
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Doenças cardiovasculares.....	11
2.2 Síndrome metabólica	12
2.3 Lipídeos e lipoproteínas.....	13
2.4 Metabolismo Lipídico	14
2.5 Dislipidemias	16
2.6 Resistência à insulina	19
2.7 Fisiopatologia da disfunção endotelial cardiovascular	20
2.8 A aterosclerose e inflamação.....	24
2.9 Hipertrofia ventricular esquerda (Lesão Aterosclerótica)	30
2.10 Tratamento da hipercolesterolemia	31
2.11 Fitoterapia e os compostos bioativos vegetais.....	32
2.12 <i>Morus nigra</i> L.....	34
2.12.1 Toxicidade de <i>Morus nigra</i> L.....	36
2.13 Modelo animal: camundongos knockout para o LDLr (LDLr -/-)	38
3 REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO 2	53
Efeito do extrato das folhas de amoreira (<i>Morus nigra</i> L.) no processo inflamatório cardiovascular e na resistência insulínica de camundongos dislipidêmicos.....	53

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças circulatórias constituem o maior ônus para a saúde no mundo, sendo responsáveis por mais de 17 milhões de mortes a cada ano, o que representa metade de todas as mortes por doença não transmissível. Mais pessoas morrem anualmente por essas enfermidades do que por qualquer outra causa, sendo que, em 2015 representaram 31% de todas as mortes em nível global. Desses óbitos, estima-se que 7,4 milhões ocorrem devido às doenças cardiovasculares e 6,7 milhões devido a acidentes vasculares cerebrais (OPAS, 2018).

Obesidade, aterosclerose e hipertensão, quando associadas em um único paciente, constituem uma série de fatores metabólicos de risco conhecidos como síndrome metabólica (SM). Essa síndrome está relacionada a distúrbios no metabolismo de insulina e de lipídeos, como a hiperinsulinemia e dislipidemias, caracterizadas por concentrações plasmáticas elevadas de triglicérides (TG) e LDL, associado a reduções das concentrações de HDL. Estudos mostram que existe uma relação próxima entre essa síndrome e a resistência à insulina (ALIBASIC, et al., 2015; CHEN et al., 2015; CORICA et al., 2019).

A hipercolesterolemia é um acompanhamento comum da aterosclerose e pode estar associada à hipertrofia cardíaca. A trílogia que consiste no processo inflamatório, disfunção endotelial e estresse oxidativo no ambiente cardiovascular são considerados o denominador comum entre as condições que promovem e apóiam a hipertrofia cardíaca e aterosclerose. Recentemente, evidências crescentes apóiam um papel central da interação entre o ligante CD40 (CD40L) e o CD40 (seu receptor de membrana) na patogênese da aterosclerose (MOTTA et al., 2013) e hipertrofia ventricular esquerda. O ligante CD40 (CD40L), que pode se apresentar na forma livre ou solúvel, é uma proteína transmembrana e compõe uma via fisiopatológica intimamente envolvida na inflamação e na aterogênese. O CD40L tem potencial para iniciar uma resposta inflamatória na parede vascular. A inibição da sinalização de CD40 pode, efetivamente, reduzir a aterosclerose e a hipertrofia cardíaca em camundongos.

Métodos farmacológicos mais comuns para o controle das hiperlipidemias são o uso de estatinas, fibratos e niacina. Estes fármacos possuem efeitos anti-hiperlipidêmicos, reduzindo os níveis de LDL sérico e inibindo a síntese de colesterol no fígado. Entretanto, as limitações que existem no uso desses medicamentos, assim como os efeitos colaterais, tais

como insuficiência hepática e renal, diarreia, hipoglicemia, fazem esses medicamentos intoleráveis para alguns pacientes que necessitam administrá-los. Dessa forma, a busca por novas alternativas que visam encontrar novos compostos que aumentem a eficácia e também diminuam a sua toxicidade, evolui cada vez mais, incentivando o desenvolvimento de novas pesquisas que busquem alternativas em compostos naturais.

As plantas medicinais são de grande importância na saúde primária, além disso, são importantes para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis eram originados de fontes naturais, dos 252 fármacos considerados essenciais, 11% possuem origem de plantas consideradas medicinais (BRASIL, 2016). Essas são, tradicionalmente, fontes naturais mais antigas, que possuem pouco ou nenhum tipo de efeito colateral, tornando-se de grande valia para a sua exploração e pesquisas com o intuito de identificar seus potenciais terapêuticos (RADDY et al., 2015).

A espécie *Morus nigra* L., conhecida popularmente como amoreira, amoreira-negra ou amora-preta é encontrada em áreas de clima tropical, subtropical e zonas temperadas, estando plenamente aclimatada no Brasil. Seu valor está no seu emprego na indústria de alimentos (na produção de bebidas, geleias e conservas), seu valor econômico (alimentação de animais, por exemplo, o bicho da seda) e sua aplicação terapêutica como antidiabético através da infusão de suas folhas. Há na literatura, diversos estudos relatando que as folhas de *Morus nigra* possuem propriedades antioxidantes, anticarcinogênica, hipoglicemiante e antiobesidade. Em seus estudos, Padilha (2010) mostrou um potencial anti-inflamatório das folhas de *Morus nigra*, no entanto, sem estabelecer mecanismos de ação.

Portanto, a abordagem de opções alternativas no tratamento das dislipidemias é de extrema relevância, uma vez que essa condição patológica já é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo. Nesse contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de extrato da folha da amoreira em prevenir a inflamação cardiovascular em camundongos hipercolesterolêmicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) impõem limitações à qualidade de vida relacionada a aspectos físicos, sociais, financeiros e de saúde dos indivíduos. Tais doenças resultam em custos e impactos na sociedade, devido às despesas com tratamento de saúde, perda de produtividade no emprego, custos do fornecimento de assistência formal e informal e perda de bem-estar. Atualmente, as doenças circulatórias constituem o maior ônus para a saúde no mundo, sendo responsáveis por mais de 17 milhões de mortes a cada ano, o que representa metade de todas as mortes por doença não transmissível (STEVENS et al., 2018).

As dislipidemias, a hipertensão arterial sistêmica e o diabetes mellitus (DM) são consideradas as principais entidades mórbidas com implicações nos maiores índices de morbidade e mortalidade cardiovascular. Tal fato acontece, porque esses fatores de risco cardiovasculares, quando presentes, isoladamente ou associados, determinam um acelerado processo de envelhecimento dos vasos, fazendo com que mais precocemente ocorra uma resposta endotelial alterada, predispondo o vaso a todas estas condições que acarretam esta disfunção (MAGALHAES et al., 2014).

Oliveira et al (2014) apontam que a elevada prevalência de doenças cardiovasculares são decorrentes principalmente de mudanças relacionadas ao padrão alimentar, mais particularmente, ao elevado consumo de açúcares simples, gorduras saturadas e sedentarismo. As alterações nos níveis lipídicos também constituem importante fator de risco para ocorrência das DCV.

Os fatores de risco cardiovascular, tais como: dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo, atuam no processo de agressão ao endotélio vascular e culminam na gênese da placa aterosclerótica. A doença aterosclerótica tem fisiopatologia inflamatória, multifatorial, de curso crônico e acomete, principalmente, a íntima das artérias de médio e grande calibre. O depósito de lipoproteínas na parede arterial é proporcional à concentração das lipoproteínas no plasma. Além do aumento da permeabilidade das lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada (LDL-ox) (SOCERJ, 2017).

Para Macedo e Faerstein (2017), a obesidade e a dislipidemia resultam em aumento dos níveis séricos de LDL e LDL oxidadas, constituintes da placa de ateroma, e, portanto, são um fator de suma importância para a formação da placa aterosclerótica.

Apesar dos avanços nas tecnologias diagnósticas e terapêuticas da aterosclerose, as DCV continuam a crescer, principalmente nos países de baixa e média renda, pelo menor acesso a programas integrados de atenção primária para a detecção e tratamento precoce dos indivíduos expostos aos fatores de risco. Como consequência, o diagnóstico é realizado de forma mais tardia, comprometendo a efetivação do cuidado à saúde dos indivíduos, implicando incapacidade física, invalidez e/ou óbito prematuro (antes dos 70 anos de idade). Além disso, em nível macroeconômico, esse grupo de doenças impõe uma carga pesada sobre a economia desses países através da incapacidade laboral gerada, da redução da produtividade e, conseqüentemente, das rendas familiares e do gasto com procedimentos cirúrgicos de alto custo para o seu tratamento, como a revascularização e a angioplastia (OPAS, 2018).

A utilização de medicamentos, como aspirina, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina e estatinas, são medidas emergenciais para a prevenção secundárias das DCV. No entanto, a adesão a medicação, nessa fase, é muito baixa em pacientes crônicos (cerca de 45 a 60%), especialmente, àqueles tratados com múltiplos agentes farmacológicos, o que correlaciona-se diretamente com uma maior incidência de DCV e aumento nos custos diretos e indiretos dos cuidados em saúde (BANSILAL et al., 2015).

2.2 Síndrome metabólica

A obesidade, caracterizada pelo excesso de gordura corporal, está associada, ainda que silenciosamente, em alguns casos, com o desenvolvimento de várias comorbidades, a saber: resistência à insulina (RI), dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), esteatose hepática, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e aterosclerose acelerada. O conjunto dessas alterações predispõe o desenvolvimento de SM no adulto e representa um grande problema de saúde pública em todo o mundo, tendo em vista que eleva os índices de morbimortalidade por doenças cardiovasculares (CORICA D, et al., 2019).

A SM tornou-se um problema de saúde pública em ambos os gêneros, em razão de sua alta prevalência. É caracterizada por uma série de fatores de risco, normalmente associados à RI e à deposição de gordura na região abdominal. Esses fatores de risco estão interligados por aspectos bioquímicos, fisiológicos, clínicos e metabólicos, o que faz aumentar diretamente o risco de desenvolver Diabetes do tipo 2 e DCV. Isso, pode variar de incidência em diferentes populações de acordo com etnia, idade, gênero e região (urbana ou rural), e de acordo com o critério de diagnóstico (BHATT et al., 2015).

A SM pode ser compreendida como um estado inflamatório de baixo grau, resultado de uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais. A gama de fatores metabólicos alterados que constitui essa síndrome inclui: RI, adiposidade visceral, dislipidemia, disfunção endotelial, pressão sanguínea elevada e estado de hipercoagulabilidade (KAUR, 2014).

A SM representa um dos principais problemas de saúde pública, não só devido ao aumento do risco de morbidade que ela representa em diferentes populações, mas também devido à proporção epidêmica que vem tomando (MULÈ et al., 2014).

Segundo dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS,2018), os fatores de risco mais importantes para a morbidade e mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares são: a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), a Dislipidemia (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia), o Diabetes mellitus tipo II (DM II) ou RI, a obesidade ou sobrepeso, o sedentarismo e o tabagismo. Desses, os quatro primeiros têm maior impacto no aparecimento da SM. A DCV constitui a maior preocupação no DM II, sendo esse considerado fator de risco independente de Doença Arterial Coronariana (DAC) (OPAS, 2018).

2.3 Lipídeos e lipoproteínas

Os lipídios são moléculas orgânicas insolúveis em água resultantes da associação entre ácidos graxos, de cadeias curtas, médias ou longas, e glicerol, estando distribuídos por todos os tecidos do organismo. Entre as principais formas existentes, podemos destacar os TG e os fosfolipídios. Essas formas são as mais abundantes no corpo humano e desempenham funções cruciais para o metabolismo energético. O triglicerídeo é o lipídeo são mais comuns na alimentação, empregados como fonte de energia para o corpo; enquanto os fosfolipídios atuam como componente estrutural das membranas celulares. Devido à sua natureza hidrofóbica, os lipídeos são incapazes de circular livremente pelo sangue, sendo necessário um meio de transporte que permita sua distribuição aos órgãos e tecidos. Ácidos graxos de cadeias curta e média podem circular pelo sangue quando ligados à albumina, uma vez que são mais solúveis comparados aos ácidos graxos de cadeia longa. Esses últimos carecem de conversão em TG para serem transportados pelas lipoproteínas (BAYNES; DOMINICZAK, 2011).

As lipoproteínas são moléculas solúveis organizadas de modo a possibilitar o transporte de lipídios entre os tecidos periféricos e a corrente sanguínea (XAVIER et al, 2013). Elas são formadas basicamente por um núcleo hidrofóbico, composto por TG e ésteres

de colesterol, recobertas por uma membrana anfipática formada por fosfolipídios, colesterol livre e apolipoproteínas (ou apoproteínas). Existem quatro classes de lipoproteínas plasmáticas: (i) quilomícrons, (ii) lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), (iii) lipoproteína de densidade baixa (LDL) e (iv) lipoproteína de densidade alta (HDL) (BAYNES; DOMINICZAK, 2011).

2.4 Metabolismo Lipídico

Os TG's e o colesterol representam as principais gorduras vindas da dieta. Após a ingestão, sais biliares emulsificam os TG's, tornando-os mais susceptíveis à ação das lipases pancreáticas, que os digere em monoglicerídeos e ácidos graxos (AGs). Na luz do intestino, essas gorduras são envolvidas pelos sais biliares, formando as chamadas micelas, tornando possível, dessa forma, a passagem do colesterol, dos monoglicerídeos e dos AG's pela membrana apical da célula absorptiva intestinal (XAVIER et al., 2013).

No interior dos enterócitos, monoglicerídeos e ácidos graxos se combinam novamente, formando TG. No interior dos enterócitos, há a combinação do colesterol e TG com a proteína específica, formando as lipoproteínas denominadas quilomícrons (via intestinal do metabolismo das lipoproteínas). Os quilomícrons são, então, exocitados das células absorptivas intestinais e entram nos lácteos (vasos linfáticos intestinais), alcançando assim, a circulação sanguínea pelo ducto torácico, onde, enquanto circulam, sofrem hidrólise pela ação da enzima lipase lipoproteica, com a liberação de AG, glicerol e colesterol. As células musculares utilizam essa gordura na produção de adenosina trifosfato (ATP), enquanto que as células adiposas armazenam essa gordura em seu interior na forma de colesterol e TG (recombinação dos monoglicerídeos com ácidos graxos). Quilomícrons remanescentes e ácidos graxos livres (AGLs) são capturados pelo fígado, iniciando, assim, a via hepática do metabolismo das lipoproteínas (TORTORA; DERRICKSON, 2009).

O transporte de lipídeos de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL (lipoproteína de densidade intermediária) e LDL. As VLDL são lipoproteínas ricas em TG e na circulação, os TGs das VLDLs, assim como no caso dos quilomícrons, são, então, hidrolisados pela lipase lipoproteica. Os AGs, assim liberados, são redistribuídos para os tecidos, onde podem ser armazenados, como no tecido adiposo, ou prontamente utilizados, como nos músculos esqueléticos. Por ação da lipase lipoproteica, as VLDLs, progressivamente depletadas de TG, transformam-se em remanescentes, também removidos pelo fígado por receptores específicos. Uma parte das VLDLs dá origem às IDLs, que são

removidas rapidamente do plasma. Durante a hidrólise das VLDLs, essas lipoproteínas também estão sujeitas a trocas lipídicas com as HDLs e LDLs (XAVIER et al., 2013).

Segundo Xavier et al (2013), as LDLs são capturadas por células hepáticas ou periféricas, por meio dos receptores de LDL (LDLr). No interior das células, o colesterol livre pode ser esterificado para depósito por ação da enzima acil-CoA: colesteril aciltransferase (ACAT). A expressão dos LDLr nos hepatócitos é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase, enzima que converte do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico (os primeiros passos da biossíntese de colesterol). A redução da concentração sérica da LDL por inibidores da HMG-CoA ou estatinas permanece sendo a terapia mais validada por estudos clínicos para reduzir a incidência de eventos cardiovasculares. A depleção intracelular de colesterol estimula a liberação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, a síntese e a expressão na membrana celular de receptores para captação do colesterol circulante, como o receptor de LDL (LDLr). Assim, a ação das estatinas pode, potencialmente, influenciar todo o conjunto das lipoproteínas circulantes que interagem com o LDLr, como a LDL, a VLDL e remanescentes de quilomícrons.

As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação e seu principal conteúdo proteico é representado pelas apo AI e AII. O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da lecitinacolesterolaciltransferase (LCAT). A apo AI, principal proteína da HDL, é cofator dessa enzima. O processo de esterificação do colesterol, que ocorre principalmente nas HDLs, é fundamental para sua estabilização e transporte no plasma, no centro desta partícula. A HDL transporta o colesterol até o fígado, onde este é captado pelos receptores SR-B1. O circuito de transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é denominado transporte reverso do colesterol. A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, como a remoção de lípidos oxidados da LDL, a inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e a estimulação da liberação de óxido nítrico (XAVIER et al., 2013) (Figura 01).

LIPÍDEOS	COM JEJUM (mg/dL)	SEM JEJUM (mg/dL)	CATEGORIA REFERENCIAL
- HDL Colesterol não	< 160	< 160	Baixo
	< 130	< 130	Intermediário
	< 100	< 100	Alto
	< 80	< 80	Muito alto

QUADRO 01: Valores de referência para o perfil lipídico (Adultos > 20 anos) sugeridos pela Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2017), as dislipidemias são classificadas em: (i) primárias, quando estão relacionadas a fatores genéticos ou não tem causa aparente, e (ii) secundárias, quando relacionadas a outras doenças, uso de medicamentos ou estilo de vida do paciente. As dislipidemias primárias podem ainda ser classificadas de acordo com suas características genótípicas e fenotípicas. Relacionadas ao genótipo, essas podem obter a subclassificação em monogênicas (uma mutação envolvida) e poligênicas (múltiplas mutações envolvidas). A respeito do fenótipo, podem ser subclassificadas (classificação laboratorial) ao utilizar os marcadores bioquímicos de CT, HDL, LDL e Triglicérides (TG), e divididas em quatro perfis distintos: (i) hipercolesterolemia isolada, (ii) hipertrigliceridemia isolada, (iii) hiperlipidemia mista e (iv) diminuição isolada dos níveis de HDL, com associação do aumento dos níveis de LDL e/ou dos níveis de TG.

A compilação de fatores externos e internos exerce um efeito sinérgico para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, agravamento de distúrbios metabólicos, ou ainda, pode iniciar o processo de formação de placas de ateroma nos vasos sanguíneos, consequência comum do quadro de dislipidemia aterogênica (SBC, 2013.)

O perfil fenotípico da dislipidemia aterogênica é bastante singular e facilmente reconhecido, sendo ilustrado por uma elevação das concentrações de CT, em conjunto com aumento dos níveis de TG e LDL, e da diminuição dos níveis de HDL (PIRES et al., 2015). A dislipidemia aterogênica, muitas vezes, não tem um curso favorável, devido ao seu diagnóstico tardio e início assintomático (SBC, 2013). Entende-se por aterogênico todo processo capaz de produzir alterações degenerativas nas paredes das artérias. O endotélio arterial em estado saudável repele as células circulantes no sangue e é fortemente antitrombótico. Na aterogênese, uma agressão endotelial permite o depósito de lipídeos na camada íntima do vaso, o que promove a formação de placas de ateroma, acompanhadas por

uma reação inflamatória local. Em longo prazo, a presença destas placas de ateroma ocasiona a oclusão completa da luz arterial, e como consequência pode haver infarto agudo do miocárdio ou um acidente vascular cerebral (AVC), dependendo do local de acúmulo das placas (BAYNES; DOMINICZAK, 2011).

Convém salientar ainda, que o caminho metabólico alterado da VLDL, secundário ao tecido adiposo visceral em excesso, resulta num mais alto nível de partículas de LDL, que são mais agressivas ao endotélio. A LDL oxidada, por sua vez, ativa citocinas inflamatórias e moléculas de adesão que atraem mais células sanguíneas e plaquetas para a coagulação, iniciando o desenvolvimento da aterosclerose (MARANHÃO et al., 2011). A HDL, por sua vez, constitui uma lipoproteína anti-aterogênica que exerce importante papel no transporte reverso do colesterol, bem como possui efeitos antiinflamatórios e antioxidantes, e tem sido considerada um relevante fator preditor de peroxidação lipídica, independente de sexo, idade, gênero, medidas antropométricas e fatores de risco inflamatórios ou metabólicos (BOTELHO et al., 2012).

2.6 Resistência à insulina

A resistência insulínica (RI) é caracterizada pela diminuição na ação da insulina nos tecidos periféricos, o que resulta em um aumento compensatório da secreção de insulina. A desarmonia deste mecanismo leva a um gradativo decréscimo da tolerância à glicose, que pode resultar no surgimento de alterações hemodinâmicas e metabólicas, como o DM2. Isso mostra que, possivelmente, as alterações fisiopatológicas desta doença estejam presentes vários anos antes de sua expressão clínica (GAYOSO-DIZ et al., 2013).

A RI vem sendo estudada desde 1939 pelo autor inglês H. Himsworth, que demonstrou que a absorção de glicose poderia ser variável de um indivíduo para o outro conforme sua sensibilidade celular à insulina. De Fronzo, Tobin e Andres (1979), desenvolveram uma técnica específica para medir a resistência à insulina, a qual nomeou de Teste de Fixação Euglicêmica da Insulina. Em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou um critério para a delimitação da qual foi chamada pela primeira vez de SM. O *National Institute of Health, via National Cholesterol Education Program* (NCEP), juntamente com o *3^o Adult Treatment Panel* (ATPIII), em 2001, sugeriu um novo critério mais simples, no qual requeria pelo menos três componentes anormais (cintura abdominal >88cm para mulheres ou >102cm para homens, HDLc <50mg/dL para mulheres ou <40mg/dL para homens, TG>150 mg/dL,

pressão arterial com valores de corte considerando 130/85mmHg e glicemia de jejum >110mg/dL) para que o diagnóstico pudesse ser feito. No Brasil, em 2005, foi publicada a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da SM com o apoio da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBD, 2015)

Segundo Matos (2016), o mecanismo do surgimento da RI relacionada à obesidade e perfil lipídico é multifatorial, e ainda não é totalmente elucidada. Uma das hipóteses pode estar relacionada à expansão do tecido adiposo e a infiltração de células inflamatórias exacerbada neste tecido. Isto pode levar à maior liberação de AGLs e de citocinas com ação pró-inflamatória como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), estes então atuam em vias de sinalização no músculo esquelético, através de receptores específicos.

Jung e Choi (2014) reafirmam a proposição anterior esclarecendo que o tecido adiposo, além de ser a principal forma de armazenamento energético do organismo, ele vem sendo reconhecido como um órgão endócrino. O tecido adiposo, quando em excesso, pode resultar em uma disfunção de fatores secretados por ele (adipocinas), que contribuem para o surgimento de distúrbios metabólicos, através de alterações na homeostase da glicose e dos lipídeos, além de respostas inflamatórias. Adicionalmente, o acúmulo de gordura em excesso resulta na quebra dos adipócitos e, conseqüentemente na liberação de AGLs na circulação. O aumento sérico de AGL pode ser um fator crítico na modulação da sensibilidade à insulina de um tecido.

A associação entre RI e o perfil lipídico pode ser explicada pelo acúmulo de gordura abdominal (obesidade central). Os TG distribuídos no abdômen possuem *turnover* (capacidade de quebra/ transformação) mais rápido, aumentando assim a oferta de AGLs no organismo, estimulando a gliconeogênese e inibindo a filtração de insulina pelo fígado. Com isso, os TGLs contribuem para a elevação da glicemia, insulinemia e conseqüentemente a RI (SBD, 2015).

De acordo com os estudos de Silva (2008), foi encontrada uma forte associação entre os componentes da SM e a RI, principalmente entre TG e o Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA-_{IR}).

O índice HOMA-_{IR} tem sido utilizado para se estimar a RI. Trata-se de um modelo matemático desenvolvido em 1985, o qual reduz a sensibilidade à insulina pela simples medida da glicemia e insulina séricas de jejum, e tem sido um dos principais métodos para avaliar a resistência insulínica pela sua fácil aplicação e boa correlação com técnicas diretas de avaliação da RI (PONTES et al., 2012). Desenvolvido por Matthews et al. (1985), o índice

HOMA avalia a RI sendo determinado por meio do valor da glicemia e insulina de jejum, onde: $HOMA-IR = \text{glicemia (mol/dL)} \times \text{insulinemia (\mu UI/ml)} / 25$.

Considerando a forte associação entre a RI e obesidade em indivíduos aparentemente saudáveis, uma ferramenta simples como o HOMA torna-se uma importante aliada na detecção precoce da resistência à insulina (GELONEZE et al., 2009). Diante do diagnóstico de uma possível resistência insulínica, as intervenções fitoterápicas podem ajudar a aumentar a sensibilidade à insulina prevenindo o DM II e doenças cardiovasculares.

2.7 Fisiopatologia da disfunção endotelial cardiovascular

O endotélio é reconhecido como um importante modulador da função vascular. Ao contrário de sua aparente simplicidade e identidade com a morfologia celular, a contribuição da célula endotelial na homeostase vascular varia em relação a estrutura vascular em diferentes locais do corpo. Isso quer dizer que a atividade da célula endotelial difere entre grandes artérias condutoras, artérias de resistência, arteríolas pré-capilares e arteríolas. Por exemplo, no caso das grandes artérias condutoras (aorta, carótidas, coronárias, braquiais, femorais) o endotélio normal mantém uma superfície lisa que previne adesão plaquetária e de monócitos, limitando a formação de coágulos e inibindo a ação de citocinas pró-inflamatórias (SIMÃO et al., 2013). Já nos vasos de resistência, o papel fisiológico do endotélio se estende à regulação do fluxo sanguíneo regional e à modulação da pressão arterial sistêmica. Nas arteríolas précapilares, as células endoteliais estão envolvidas no transporte e distribuição de nutrientes e hormônios, bem como na disposição adequada de produtos metabólicos inúteis. Sob condições normais, muitos mecanismos integrados regulam a síntese endotelial e liberam mediadores que se contrapõem em atividades vasodilatação/vasoconstrição, antitrombótico/pró-trombótico, antiinflamatório/inflamatório, mantendo, assim, o equilíbrio adequado de fluxo sanguíneo, oferta de oxigênio e de nutrientes, além de participar do remodelamento vascular (REINER et al., 2011).

Uma das moléculas mais importantes sintetizada pela célula endotelial é o óxido nítrico (NO), de meia-vida curta. A produção de NO resulta da conversão da L-arginina em L-citrulina pela NOSintase endotelial na presença de cofatores como NADPH, FAD e tetrahidrobiopterina (BH4). A NOSintase pode ser ativada por moléculas sinalizadoras, como: a bradicinina, a adenosina, o fator de crescimento endotelial vascular (em resposta à hipóxia), a insulina e a serotonina (liberada durante a agregação plaquetária). Além da vasodilatação, o NO inibe a ativação, a secreção e a agregação plaquetárias; previne a adesão leucocitária e

inibe a migração e a proliferação das células musculares lisas vasculares. O NO também participa da manutenção do equilíbrio oxidativo/reduutivo celular ao limitar a oxidativa a nível mitocondrial (REINER et al., 2011).

Além do NO e do fator hiperpolarizante dependente do endotélio, produtos do metabolismo do ácido araquidônico, gerados a partir do sistema de cicloxigenase, também participam na função endotelial. Enquanto a prostaciclina parece ter um papel marginal na manutenção do fluxo sanguíneo local em humanos, ela contribui para alguns outros papéis regulatórios do endotélio, tanto em condições fisiológicas, como no diabetes. Há evidências que mostram um aumento no risco cardiovascular, após a administração de inibidores seletivos COX-2. A atividade mediada pelo endotélio se estende à produção de fatores vasoconstritores, cujo efeito oposto participa, não somente na regulação do fluxo sanguíneo local, mas também na estrutura e remodelamento arterial. Alguns desses fatores, incluindo angiotensina II e ânion superóxido, agem localmente, mas suas influências alcançam efeitos sistêmicos. A endotelina 1, o mais potente peptídeo vasoativo produzido pelo endotélio, age como um homólogo natural na regulação da homeostase vascular (HOTAMISLIGIL, 2011).

A disfunção endotelial é considerada o primeiro degrau na progressão da aterosclerose e DCV, além de ser fator contribuinte na etiologia das complicações do diabetes, como a retinopatia, a nefropatia, a neuropatia e a não cicatrização de feridas (CORTEZ-DIAS, 2011).

A noção da severidade da disfunção endotelial, relacionada ao risco de um evento cardiovascular inicial ou recorrente, vem aumentando o interesse em usar medidas de função endotelial na pesquisa da aterosclerose. Parece que a disfunção endotelial se constitui em um processo sistêmico, podendo ser identificado no leito vascular distal coronariano e cerebral, quando os eventos ocorrem. A DAC, dislipidemias e aterosclerose são desordens cardiovasculares com disfunção endotelial, frequentemente, vistas com altas concentrações de marcadores inflamatórios circulatórios. A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico abaixo de níveis basais causado pela RI pode ser um fator patogênico adicional nas doenças crônicas (como a aterosclerose, hipertensão arterial e diabetes), conhecidas de possuírem componentes inflamatórios (SANTOS et al., 2013).

Segundo Tchernof e Deprès (2013), a ação da insulina e a RI nas células endoteliais podem afetar a ação periférica da insulina de várias formas. Primeiro, a insulina pode causar um aumento no fluxo sanguíneo ou pode aumentar a fração de perfusão capilar num dado tempo. Segundo, o transporte transendotelial da insulina pode ser mediado pelos receptores insulínicos nas células endoteliais. A vasodilatação estimulada pela insulina pode contribuir

para a captação da glicose, através de um mecanismo que pode ser bloqueado pelo inibidor NO sintase, presente na obesidade e no DM II.

A RI nos macrófagos, contudo, promove a formação de necrose no interior da placa aterosclerótica por aumentar a apoptose de macrófagos. Esse é um evento importante na aterosclerose avançada, porque a exposição do interior necrótico na circulação sanguínea, durante a ruptura da placa, pode precipitar e desencadear diversos outros efeitos cardiovasculares (CORTEZ-DIAS, 2011).

Em condições fisiológicas normais, o endotélio vascular promove alterações funcionais adaptativas para a manutenção da hemodinâmica, por meio da liberação de substâncias com propriedades antiaterogênicas, sendo o NO a principal delas. Esse, em condições ideais, limita o recrutamento vascular de leucócitos, impedindo sua adesão à parede vascular e inibindo a agregação plaquetária, o que evita a formação de trombos. A perda da atividade biológica do NO é denominada disfunção endotelial (SANTOS, 2015).

Inicialmente, o dano é mais funcional do que estrutural. O endotélio perde sua habilidade de repelir as células inflamatórias circulantes no sangue e passa a permitir a sua adesão na parede vascular, o que o torna permeável às lipoproteínas, culminando, a longo prazo, em dano estrutural (MOTTA et al., 2013). O aumento da permeabilidade endotelial favorece a entrada da LDL-C para a região íntima vascular, onde não são capazes de serem absorvidas, o que favorece seu acúmulo e oxidação (SILVA et al., 2011). Segundo Motta et al. (2013), o acúmulo de LDL, unido à proliferação de células para a luz do vaso arterial, tem sido apontado como um fator desencadeante para aterogênese, por meio da promoção de reação inflamatória local exacerbada. Unido a isto, o aumento dos níveis de LDL gera um maior consumo de NO com liberação de radicais livres, os quais, por sua vez, promovem a oxidação da LDL acumulada, formando a LDL oxidada (LDLox), partículas que possuem potencial aterogênico acentuado e elevada citotoxicidade. A citotoxicidade da LDLox agrava a disfunção endotelial, gerando a expressão de quimiocinas pelas células lesionadas do endotélio, favorecendo o recrutamento de neutrófilos para o interior do vaso sanguíneo. Paralelamente, a LDLox estimula também a migração de monócitos e sua diferenciação em macrófagos, os quais endocitam as partículas oxidadas através dos receptores *scavengers* e promovem a formação das células espumosas – componentes essenciais da placa aterosclerótica.

Para Santos (2015), a endocitose das LDLox exerce papel ambíguo na fisiopatologia da doença: enquanto possui teor protetor por conta da remoção das partículas oxidadas, o mesmo processo também induz a produção de radicais livres responsáveis por agravar a lesão

endotelial, conseqüentemente, promovendo a expressão de mais quimiocinas, as quais, por sua vez, irão recrutar novos monócitos e estimular a projeção das células musculares lisas para a luz do vaso sanguíneo, estabelecendo o dano estrutural. Isso desencadeia um processo sistêmico que envolve proteínas da coagulação e promove a evolução da lesão aterosclerótica por meio do perpetuamento do processo inflamatório.

Na Figura 02 é possível visualizar a patogênese da aterosclerose.

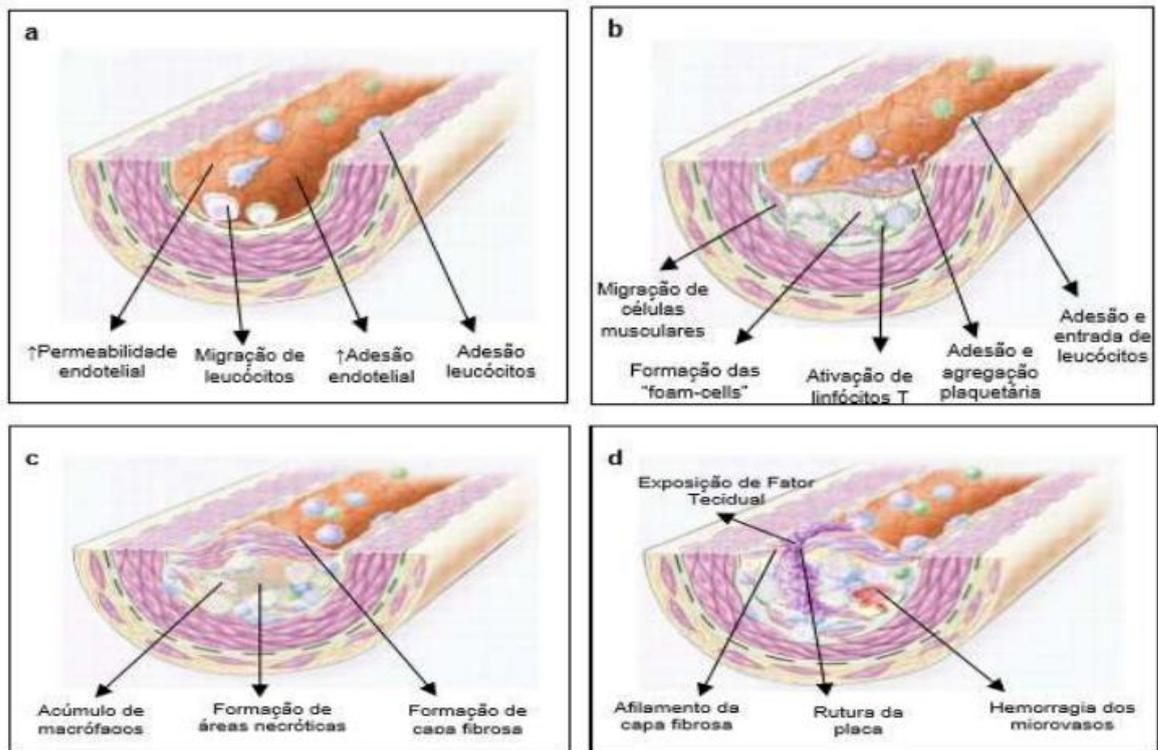


Figura 02. Fases do desenvolvimento da placa aterosclerótica. a) Disfunção endotelial; b) Lesão inicial (“fatty streak”); c) Lesão avançada; d) Placa instável. Figura adaptada de Ross (1999).

2.8 A aterosclerose e a inflamação

Vários são os fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose, entre eles: hiperlipidemia (valores anormalmente elevados de colesterol, triglicérides ou ambos), elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial sistêmica, estilo de vida, entre outros (XAVIER et al., 2013).

Várias teorias foram propostas para explicar o início do processo inflamatório na aterosclerose, a mais aceita é a união da hipótese de resposta à lesão endotelial, somada à

hipótese oxidativa. O endotélio lesado pelo acúmulo LDLox torna-se ativado, expressando moléculas de adesão e promove a liberação de mediadores da resposta inflamatória e imunológica. O evento crítico inicial na gênese da aterosclerose é a lesão endotelial, caracterizada pela diminuição da produção de NO, concomitante à liberação de vários mediadores inflamatórios e moléculas quimioatraentes em resposta à injúria tecidual, desencadeada pelo acúmulo de LDL na parede das artérias. Desse modo, a injúria causada no endotélio aumenta a adesão de leucócitos e plaquetas no local da lesão, bem como a sua permeabilidade, favorecendo a infiltração dessas células no espaço subendotelial. Essa injúria também faz com que o endotélio exerça propriedades pró-coagulantes ao invés de anticoagulantes (MOTTA et al., 2013).

Segundo Ammirati et al. (2015), aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Em geral, as lesões iniciais, denominadas estrias gordurosas, formam-se ainda na infância e caracterizam-se por acúmulo de colesterol em macrófagos. Com o tempo, mecanismos protetores levam ao aumento do tecido matricial, que circunda o núcleo lipídico, mas na presença de subtipos de linfócitos de fenótipo mais inflamatório, a formação do tecido matricial se reduz, principalmente por inibição de síntese de colágeno pelas células musculares lisas que migraram para íntima vascular e por maior liberação de metaloproteases de matriz, sintetizadas por macrófagos, tornando a placa lipídica vulnerável a complicações.

Assim, como os conhecimentos sobre o papel endócrino do tecido adiposo avançaram a passos largos, também evoluiu o que se conhece sobre a aterosclerose. Por muito tempo, essa foi considerada simplesmente como resultante de um acúmulo de lipídios na parede arterial. No entanto, nas últimas duas décadas, o crescente aumento de estudos no campo vascular tem fornecido inúmeros detalhes à definição inicial da doença aterosclerótica (OHKUMA et al., 2015).

A aterosclerose é uma DCV, caracterizada pela inflamação crônica da parede da artéria e consequente formação de placas (Figura 03), assim como pela ativação de diferentes células inatas do sistema imune que estão envolvidas diretamente na gênese do depósito das substâncias constituintes dessas placas, que são compostas principalmente de lipídios, de cálcio e de células inflamatórias. As lesões ateroscleróticas são, de fato, uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas e dinâmicas, essencialmente inflamatórias, por natureza (GREMMEL et al., 2015).

O processo inflamatório, além de aumentar o risco de hipertensão e DM2, também promove elevação dos níveis de citocinas, o que está diretamente relacionado a recrutamento de monócitos e infiltração de macrófagos na parede arterial, com formação da placa. Como são processos lentos e assintomáticos, os sinais podem demorar anos para se manifestar, assim, o uso de marcadores como a PCR-us é um importante indicador. A presença de hipertensão também se relaciona com o aumento do estresse oxidativo e consequente desencadeamento do processo inflamatório na parede dos vasos (ALIE et al., 2015), como se vê na figura 03:

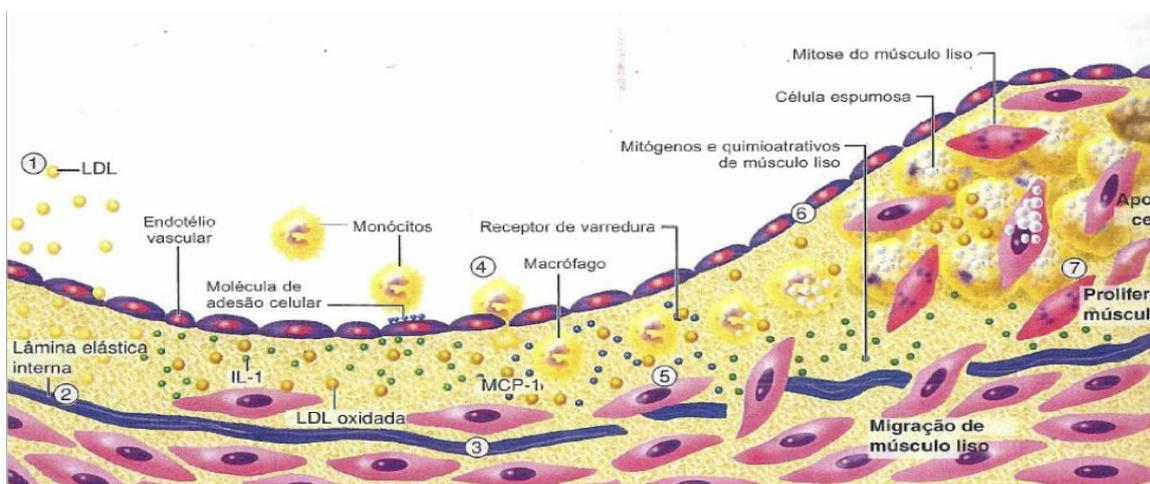


Figura 03. Moléculas e células envolvidas na aterosclerose coronariana. Fonte: Adaptado de LIBBY, 2008.

A LDL é o principal transportador de colesterol do plasma para os tecidos. É formado por núcleo hidrofóbico contendo colesterol esterificado e resíduos de triglicérides, sendo esse núcleo envolto por uma camada monofásica de fosfolípidos e colesterol livre. Seu conteúdo de triglicérides é apenas residual, resultante do catabolismo das VLDLs pela ação da lipase (WIKINSKI, et al., 2010). A LDL é formada por apenas uma apolipoproteína, a apoB-100, apo essa reconhecida pelos receptores específicos (receptores para LDL) e que exerce papel fundamental no metabolismo dessa lipoproteína (XAVIER et al., 2013).

A apolipoproteína A (apoA) é a principal constituinte da HDL e sua concentração sérica está intimamente relacionada com a concentração do colesterol da HDL. Existem duas formas de apo A, sendo apoA-I e apoA-II. A apoA-I corresponde a quase 70% do conteúdo protéico da HDL e a apoA-II menos, em torno de 20%. Elas são de extrema importância para o metabolismo do HDL. A apoA-I é importante cofator para a LCAT, além de possuir importante contribuição no papel antioxidante da molécula de HDL (PODREZ, 2010).

Tanto a apoA, quanto a apoB possuem importante papel na predição do risco cardiovascular, pois a apoB está presente em partículas aterogênicas, enquanto que a apoA está presente na HDL, partícula antiaterogênica. Dessa forma, a razão apoB/apoA é um importante marcador de risco cardiovascular (SOUZA et al., 2007).

Baixas concentrações de HDL, associados frequentemente à hipertrigliceridemia, são diretamente proporcionais e relacionados ao maior risco de desenvolvimento da aterosclerose. A diminuição da atividade da lipoproteína lipase tem sido implicada no desenvolvimento da aterosclerose por sua atuação no metabolismo lipoprotéico, hidrólise de triglicérides em quilomícrons, VLDL, IDL e, ações no remodelamento da HDL, ajudando indiretamente com o efluxo do colesterol e fosfolipídios das lipoproteínas (VIEIRA et al., 2011)

Para Volp et al. (2008), o processo inflamatório está diretamente relacionado com doenças cardiovasculares. Para medir o grau da inflamação subclínica, vários biomarcadores inflamatórios têm sido propostos. A reação de inflamação induzida pelos fatores de risco e a resposta imunológica associada são os principais eventos que conduzem ao processo de aterogênese.

Alguns estudos mostram marcadores inflamatórios, como a Interleucina-6 (IL-6) e Proteína C-Reativa (PCR) atuando diretamente no *down regulation* da NO e diminuindo a vasodilatação dependente do endotélio, aumentando com isso o processo de disfunção endotelial através da diminuição da concentração de NO e do aumento de a endotelina-1 (ET-1), que age em sentido oposto ao NO, com efeito vasoconstritor (HEIN et al., 2009). Além desses dois biomarcadores, pode-se citar também o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α).

A IL-6 é uma importante citocina envolvida em diversos processos imunológicos e atua na regulação metabólica da Proteína C-Reativa (PCR). Durante uma reação inflamatória, a IL-6 e a PCR podem causar efeitos indesejáveis em diversos órgãos. Portanto, o aumento dos níveis séricos de IL-6 e PCR podem causar um *down regulation* na produção de NO, por inibição da enzima óxido nítrico sintase endotelial, facilitando a formação de trombos e, conseqüentemente, o risco de eventos cardiovasculares, conforme mostra a figura 04 (RAMOS et al., 2009).

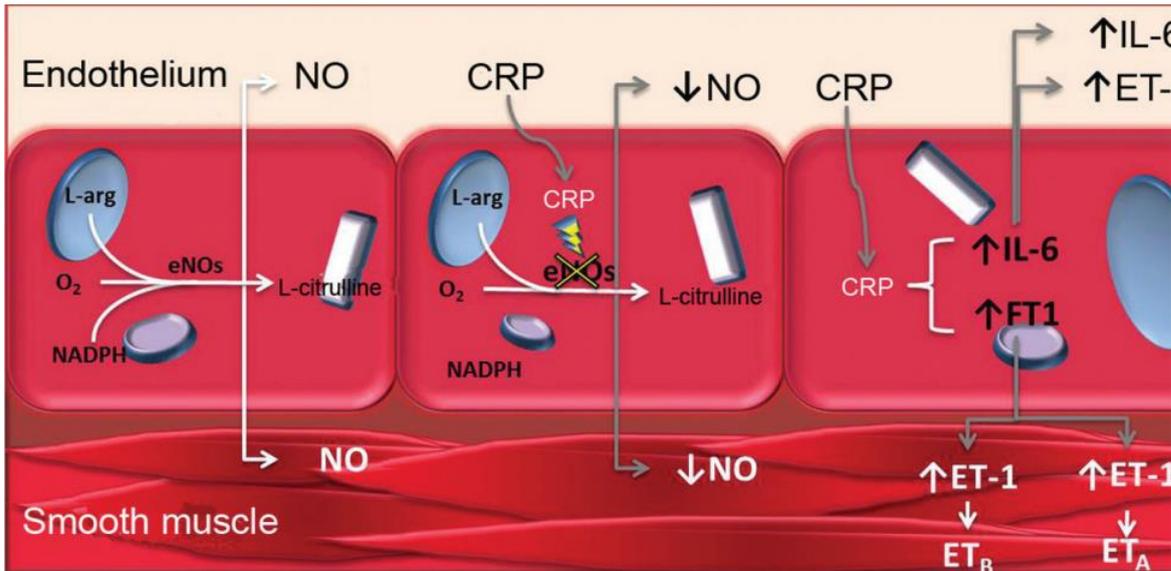


Figura 04: Mecanismo de diminuição da produção de óxido nítrico NO por meio da inibição da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) pela proteína c-reativa (PCR). NO – óxido nítrico; PCR – proteína c-reativa; ET – Endotelina; IL-6 Interleucina-6; O₂ – Oxigênio; NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

A IL-6 e o TNF- α podem regular a síntese de PCR. Estudos prévios mostram que esta proteína pode exercer importantes efeitos pró-inflamatórios e, quando se liga a moléculas resultantes de inflamação ou infecção, desencadeia a ativação do complemento, o que leva à lesão tecidual (VOLP et al., 2008). A IL-6 é liberada em resposta ao estímulo do TNF- α . A elevação dos níveis plasmáticos da IL-6 está aumentada em pacientes com desenvolvimento da hipertrofia dos cardiomiócitos e disfunção de ventrículo esquerdo (VE).

A hiperglicemia relaciona-se à inflamação devido à formação de produtos avançados de glicação (AGEs), que podem levar à síntese de IL-6, à ativação de macrófagos e ao estresse oxidativo, o que culminaria com a produção de PCR, contribuindo para a inflamação. Os AGEs derivam da reação não enzimática da glicose (além de sua oxidação) com proteínas, lipídeos e também ácidos nucleicos, levando ao estresse oxidativo e ao subsequente desenvolvimento de processos inflamatórios e trombóticos; essas condições explicam, em parte, a relação do DM com os eventos cardiovasculares. Os AGEs elevam a produção de espécies reativas de oxigênio, prejudicando a função dos sistemas antioxidantes (NOWOTNY et al., 2015).

O endotélio é fonte de uma grande variedade de agentes vasoativos que atuam controlando o tônus vascular, fatores de crescimento, função plaquetária e coagulação. Entre essas substâncias vasoativas está o NO, que desempenha uma importante função protetora contra o processo aterosclerótico, mantendo o vaso sanguíneo em um estado constante de vasodilatação (MATSUOKA, 2001).

O NO causa dilatação em todos os tipos de vasos sanguíneos por meio da ativação da proteína guanilato-ciclase solúvel, que promove a conversão de guanina trifosfato (GTP) em guanina monofosfato cíclico (GMPc) em células musculares lisas. Isso leva ao relaxamento da musculatura vascular lisa e a concomitante vasodilatação, principal marcador da função endotelial (FORSTEMANN; MUNZEL, 2006). Ao mesmo tempo, mudanças na função endotelial podem ser precursoras de doenças vasculares, como a aterosclerose. O termo “disfunção endotelial” refere-se tanto ao desequilíbrio entre os agentes vasoativos que atuam controlando o tônus vascular, quanto à agregação plaquetária, à coagulação e à fibrinólise, porém o tônus vascular tem sido o aspecto mais estudado. Devido a esses fatores, existe uma piora no relaxamento dependente do endotélio, causada, entre outros aspectos, pela perda da biodisponibilidade do NO. Doenças como hipertensão arterial, diabetes mellitus e hipercolesterolemia podem causar danos ao endotélio, gerando disfunção endotelial que em grande parte das vezes está relacionada à aterosclerose e aos eventos cardiovasculares (TEIXEIRA et al., 2014).

Para manter a homeostase, além do NO, o endotélio produz substâncias vasodilatadoras, tais como prostaciclina e cininas, e também substâncias vasoconstritoras (angiotensina II e endotelina). Outros fatores importantes são a geração do ativador do plasminogênio tecidual, a liberação de substâncias anti-inflamatórias, a liberação de peptídeos natriuréticos e a atividade normal da enzima superóxido dismutase; evitando a instalação de uma situação de estresse oxidativo. Quando a função do endotélio é normal, a atuação conjunta dessas substâncias resulta na conservação do padrão de fluxo sanguíneo laminar e evita a formação e o desenvolvimento da arteriosclerose (RAMACHANDRAN et al., 2002).

Em situações de estresse oxidativo, a presença de radicais superóxido na vasculatura leva à reação com o NO local, formando peroxinitrito. As moléculas de peroxinitrito provocam danos por atuarem diretamente no DNA celular, além de induzir o desacoplamento da NO sintase endotelial (eNOS). Nessa condição, a enzima produz radicais superóxido, exacerbando o estresse oxidativo e o dano endotelial. Por outro lado, o dano endotelial criado ativa a enzima NO sintase induzível (iNOS), aumentando a síntese de NO. Como resultado desse processo, uma resposta inflamatória será gerada, com o recrutamento de monócitos e células T para a parede do vaso. A inflamação associada ao estresse oxidativo são os fatores determinantes na etapa inicial da arteriosclerose (CHAMPLAIN et al., 2004). As LDLs plasmáticas sofrerão oxidação ao chegar à região da íntima arterial, em virtude do estresse oxidativo instalado. Os macrófagos expressam receptores (scavengers) para lipoproteínas modificadas, englobando partículas minimamente oxidadas de LDL, formando as células

espumosas (VASCONCELOS et al., 2007). A molécula de LDL oxidada pode, ainda, causar disfunção do endotélio vascular, alterando seus mecanismos vasodilatadores e anticoagulantes. Além disso, como resultado desse processo, ocorre necrose de células espumosas, deposição de colesterol, fibrose e proliferação de fibras musculares lisas; lesões que promovem a geração de saliências resultando em estreitamento da luz do vaso, contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica observado na hipertensão arterial e, em casos de bloqueio da circulação, resultando em infarto (EVANS; GOLDFINE, 2013).

Outro marcador de inflamação é o CD40, expresso por linfócitos T e por plaquetas ativadas, além de ser expresso por células endoteliais na superfície de células musculares lisas e em macrófagos. O CD40L é o ligante desse marcador e, na forma solúvel, também pode ser encontrado como proteína transmembrana. Níveis elevados desse ligante também podem indicar risco aumentado de DCV (GURURAJAN et al., 2009).

O ligante CD40, que pode se apresentar na forma livre ou solúvel, é uma proteína transmembrana de tipo II que pertence à superfamília do TNF e compõe uma via fisiopatológica intimamente envolvida na inflamação e na aterogênese (PAMUKCU et al., 2011). O CD40L origina-se principalmente de plaquetas que, apesar de serem essenciais para a homeostasia, também têm potencial para iniciar uma resposta inflamatória na parede vascular. Uma vez ativadas, plaquetas prontamente expressam CD40L e o aparecimento dessa molécula em sua superfície induz as células endoteliais a secretarem quimiocinas e expressarem moléculas de adesão, promovendo, assim, o recrutamento e extravasamento de leucócitos no local da lesão (WENZEL et al., 2008).

O CD40L pode rapidamente desprender-se da membrana plaquetária, apresentando-se na forma solúvel. Ambas as formas têm atividade pró-trombótica e pró-inflamatória, aumentando a ativação, a agregação plaquetária e a conjugação de plaquetas-leucócitos e de eucócito-endotélio. Ainda, aumentam a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir de plaquetas estimuladas. Resumindo, esse sistema de ativação de CD40L promove um estado inflamatório crônico na parede vascular e isso contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial, aterogênese e suas respectivas complicações (PAMUKCU et al., 2011).

A visão da patogênese da lesão aterosclerótica teve diversas modificações ao longo do último século. No início, acreditava-se, que as lesões ocorriam pelo acúmulo passivo de lipídeos nas artérias. No entanto, há cerca de 30 anos, com a detecção de linfócitos T ativados, e a

descoberta de novas moléculas e citocinas, uma nova hipótese relaciona o excesso de lipídeos, dano endotelial e células musculares lisas ao desenvolvimento de uma resposta crônica, integrando em si as bases para patogênese dessa doença (WITZTUM; LICHTMAN, 2014).

2.9 Hipertrofia ventricular esquerda (Lesão aterosclerótica)

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é definida como aumento da massa ventricular, ou do índice de massa do ventrículo esquerdo (VE), o qual é calculado corrigindo-se o valor da massa, em gramas (g), pela área de superfície corpórea, em metros quadrados (MATHIAS JR, 2007). Para Almeida (2006), o aumento da massa do ventrículo esquerdo pode resultar de sobrecarga pressórica ou volumétrica, traduzindo uma resposta adaptativa do miocárdio ao excesso de demanda. Embora inicialmente constitua uma alteração necessária para adequar o coração à demanda aumentada, a hipertrofia do ventrículo esquerdo acompanhando a hipertensão arterial é uma alteração patológica.

Segundo Kannel (1983), os indivíduos que apresentaram HVE, diagnosticada por alterações eletrocardiográficas, apresentaram risco de morte seis vezes maior que a população em geral. A HVE é caracterizada como um conjunto de alterações estruturais decorrentes do aumento das dimensões dos cardiomiócitos, da proliferação do tecido conjuntivo intersticial e da rarefação da microcirculação coronariana (WOLLERT; DREXLER, 2002).

Garcia e Incerpi (2008) citam que, entre os fatores que induzem a HVE, estão os fatores hemodinâmicos, como a sobrecarga da pré e pós-carga ao coração, o aumento da necessidade metabólica e os fatores neuro-humorais, incluindo catecolaminas, angiotensina II, insulina, além do estresse oxidativo e hipercolesterolemia.

A hiperinsulinemia no quadro de RI favorece o desenvolvimento da HVE via ativação de quinases de serina/treonina que fosforilam o substrato do receptor de insulina (IRS)-1 em serina, o que causa a inibição da via fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) proteína quinase B (Akt) e a ativação da via da quinase ativada por mitógenos (MAPK), incluindo a quinase regulada por sinalização extracelular (ERK) (BROWNSEY et al., 1997). Essa via de sinalização que depende da ativação das MAPKs induz estresse oxidativo e crescimento celular, o que contribui para o desenvolvimento da HVE e aumento do risco cardiovascular associado à hiperinsulinemia e RI (GARCIA; INCERPI, 2008).

2.10 Tratamento da hipercolesterolemia

O tratamento da hipercolesterolemia deve incluir medidas não farmacológicas, que estão recomendadas para todos os pacientes, assim como o uso da terapia farmacológica que pode ser indicada em situações específicas (SIMAO et al., 2013). As drogas disponíveis atualmente para o tratamento da hipercolesterolemia incluem as estatinas (inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A [HMG-CoA] redutase), a ezetimiba (inibidor seletivo da absorção do colesterol) e as resinas ou sequestradores dos ácidos biliares. As estatinas devem ser utilizadas como primeira escolha, por apresentarem potente efeito na redução do LDL-C (25-55%) e por serem as drogas mais validadas por estudos na redução de eventos cardiovasculares. A ezetimiba apresenta um efeito moderado na redução do LDL-C (15-25%). As resinas podem ser associadas às estatinas quando a meta de LDL-C não é alcançada apesar do uso de estatinas, levando a uma redução de 5 a 30% nos níveis de LDL-C (PIEPOLI et al., 2016).

Entretanto, as limitações que existem no uso desses medicamentos, assim como os efeitos colaterais, tais como insuficiência hepática e renal, diarreia, hipoglicemia, fazem esses medicamentos intoleráveis para alguns pacientes que necessitam administrá-los. Dessa forma, a busca por novas alternativas que visam encontrar novos compostos que aumentem a eficácia e também diminuam a sua toxicidade, evolui cada vez mais, incentivando no desenvolvimento de novas pesquisas que busquem alternativas em compostos naturais (ZANG et al., 2016).

O tratamento não medicamentoso da dislipidemia deve englobar modificações de hábitos alimentares associados a atividade física, além da perda ponderal, quando indicada (SIMAO et al, 2013). Na abordagem nutricional, deve-se limitar a ingestão de ácidos graxos saturados e trans, assim como de colesterol, além aumentar a ingestão de fibras solúveis. O consumo de fitosteróis também está indicado no tratamento da hipercolesterolemia, segundo várias diretrizes e consensos de diferentes sociedades em todo o mundo (PIEPOLI et al, 2016). Existem evidências consistentes de que a ingestão de fitosteróis (2 g/dia) está associada a uma redução significativa do LDL-C (8-10%) (GYLLING et al., 2014).

As plantas medicinais são de grande importância na saúde primária, além disso, são importantes para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Em 2016, estimava-se que 40% dos medicamentos disponíveis eram originados de fontes naturais; dos 252 fármacos considerados essenciais, 11% possuem origem de plantas consideradas medicinais (BRASIL, 2016). Essas são tradicionalmente fontes naturais mais antigas, que possuem pouco ou

nenhum tipo de efeito colateral, tornando-se de grande valia para a sua exploração e pesquisas com o intuito de identificar seus potenciais terapêuticos (RADDY et al., 2015).

2.11 Fitoterapia e os compostos bioativos vegetais

A fitoterapia e o uso de plantas medicinais fazem parte da prática da medicina popular, constituindo um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários e praticantes, especialmente pela tradição oral. O conhecimento das plantas, e também seu uso como medicamento, têm acompanhado o homem ao longo dos anos. No entanto, a Fitoterapia entrou em declínio em meados do século XX, devido à intensificação do processo de industrialização, bem como dos medicamentos industrializados (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012), e de interesses mercantilistas, que cada vez mais presentes no setor saúde, tiveram importante papel na desvalorização do uso de fitoterápicos (FIGUEREDO, 2014).

De maneira geral, o crescimento dos fitoterápicos no Brasil acompanhou o crescimento da indústria farmacêutica. Em 2011, o mercado de fitoterápicos movimentou cerca de R\$ 1,1 bilhão no Brasil, quando foram comercializados 43 milhões de unidades desse tipo de medicamento, representando um aumento de 13% em relação ao ano anterior. A receita total do setor farmacêutico no país foi de R\$ 43 bilhões em 2011 (ALVES, 2013). Segundo dados de 2016 do Ministério da Saúde, entre 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo SUS mais que dobrou: o crescimento foi de 161%. Em 2013, cerca de 6 mil pessoas procuraram alguma farmácia de atenção básica para receber os insumos. Já em 2016 essa procura passou para quase 16 mil, em em 2016, aproximadamente 3.250 estabelecimentos de 930 municípios brasileiros oferecem esses produtos.

Em busca de uma melhor qualidade de vida, observa-se uma tendência cada vez maior na busca de produtos naturais mais saudáveis. Atualmente, pode-se afirmar, sem medo dos equívocos das generalizações, que o mundo está aberto a produtos mais saudáveis, mais seguros, entre eles os fitoterápicos (MAZIERO; PINHEIRO, 2017)

O advento da tecnologia da informação (internet), verificado a partir da década de 90, vem contribuindo para a ampla difusão da fitoterapia colaborando para a promoção do uso e gerando novas demandas por plantas medicinais exóticas e desconhecidas até então pelas comunidades tradicionais brasileiras (SÁ, 2016). No entanto, uma faixa considerável da população brasileira, ainda não tem conhecimento dos benefícios dos medicamentos fitoterápicos. Outro fator importante é que as prescrições médicas desses compostos ainda são

inferiores às dos países desenvolvidos. De acordo com os especialistas da área da saúde, existem vários obstáculos que prejudicam o desenvolvimento da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos. Entre os principais apontados estão: a falta de informação para prescritores, o uso de plantas exóticas e os altos custos com pesquisas (DANTAS DE BRITO et al., 2015.)

No cenário brasileiro, instituições governamentais e não governamentais, de ensino, pesquisa e assistência médica, vêm desenvolvendo estudos sobre as plantas e promovem eventos técnico-científicos para divulgar a fitoterapia. Esses eventos são alicerçados na Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que visa ampliar o acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, voltada para a segurança, eficácia, qualidade e integralidade da atenção à saúde dos brasileiros, além do desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (IBIAPINA, 2014). Essa política representa o reconhecimento do avanço na comprovação científica da eficácia e da segurança das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos (FIGUEIREDO et al., 2011), juntamente com o saber popular nesse campo, além de constatar que a prática da terapêutica centrada no uso de medicamentos sintéticos não cumpriu a promessa implícita e explícita de dar conta do tratamento das doenças: pelos altos custos, pelos significativos efeitos adversos que têm os medicamentos sintéticos, pelos resultados nem sempre satisfatórios - o que tem levado grande número de pessoas a buscar formas alternativas de tratamento menos agressivas (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Observa-se um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Dois fatores poderiam explicar este aumento. O primeiro seriam os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes. O segundo é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Muitos alimentos, bebidas, chás e extratos de origem vegetal, são empregados popularmente para tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares. A literatura científica relata importantes atividades biológicas de diversos compostos na tentativa de se evitar a progressão do processo aterosclerótico. Verifica-se que, por vezes, o consumo desses produtos de origem vegetal é popularmente feito com o intuito de tratar ou reduzir o risco de doenças, isso por que produtos de origem vegetal apresentam substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, as quais podem exercer atividades farmacológicas (STANGL et al., 2006).

Os vegetais apresentam, em sua composição, metabólitos secundários que foram desenvolvidos em seu organismo para defesa contra ataque de herbívoros ou proteção contra os efeitos deletérios promovidos pela radiação ultravioleta. Esses metabólitos podem promover atividades biológicas nos humanos, sendo que a classe dos compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, oferece propriedades benéficas como a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (ALMEIDA-CINCOTTO, 2016).

Segundo Wink (2016), os metabólitos secundários são produzidos durante a fotossíntese e ainda que não participem de modo direto nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução como os metabólitos primários, são primordiais para a sobrevivência da planta e perpetuação de sua espécie. Eles são elementos biologicamente ativos com habilidades de interferir a nível molecular no organismo. Assim, a ação desses compostos presentes em alimentos vegetais na conservação da saúde humana tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos.

O conhecimento sobre os compostos bioativos influenciou o conceito de alimentos funcionais. Segundo a ANVISA (2002), compostos bioativos são os nutrientes e não nutrientes que possuem ação no metabolismo ou fisiológico específico. Nesse cenário a palavra *saúde* ganha um novo sentido no conhecimento dos alimentos, de modo que a alimentação apropriada, não somente preocupa-se em fornecer energia e nutrientes essenciais, como ressalta a importância dos compostos bioativos, uma vez que são capazes de exercer efeitos fisiológicos benéficos, podendo prevenir ou reduzir o risco do desenvolvimento de muitas doenças, entre elas, as cardiovasculares (COSTA; JORGE, 2011).

2.12 *Morus nigra* L

Morus nigra L. (amoreira preta), é uma espécie de planta originária da Ásia, mas que foi bem aclimatada no Brasil. É uma planta cultivada em jardins e sua fruta fresca é de difícil comercialização, devido à fragilidade e, por isso, seu comércio é realizado, principalmente, na forma de geléia. Embora a fruta seja comercializada com a finalidade alimentícia, outras partes da amoreira preta, como caule e folhas, podem ser utilizadas com finalidades terapêuticas (ALMEIDA-CINCOTTO, 2016).

A espécie *Morus nigra* L. (Figura 05) pertence ao gênero *Morus*, família *Moraceae* e teve sua origem na Ásia. O gênero *Morus* é constituído por aproximadamente 24 espécies, uma subespécie e pelo menos 100 variedades. A espécie *Morus nigra* L. foi aclimatizada no Brasil sendo uma espécie não nativa (PADILHA, 2010).



Figura 05: *Morus nigra* L. (Fonte: Autor).

As folhas de *Morus nigra* L., são abundantes e possuem função importante na produção de seda, principalmente na China. Elas são usadas na medicina tradicional, apresentam valor agrônômico por servirem de biomassa para alimentação de gado, assim como alimento humano na forma de bebidas, infusões, corantes naturais e outros alimentos (PARK et al, 2013).

Estudos com as folhas deste gênero, embora escassos, correlacionam agentes bioativos como os compostos fenólicos com diversas ações biológicas, tais como antimicrobianas, antialérgicas, efeitos antidepressivos e neuroprotetores acompanhados do decréscimo do estresse oxidativo (DALMARGO et al., 2017) Apesar das folhas de amoreira preta apresentarem altos níveis de compostos fenólicos, esses são instáveis e podem ser degradados quando submetidos a processamentos de secagem, conservação e armazenamento, principalmente quando expostos ao oxigênio e a temperaturas elevadas (KATSUBE et al, 2009).

Algumas das propriedades terapêuticas verificadas em *Morus nigra* L. são as seguintes: analgésica, diurética, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, lipolítica, cicatrizante, antisséptica, vermífuga, hipoglicemiante, tratamento do climatério, entre outras. Além disso, outras espécies pertencentes ao gênero *Morus*, também apresentaram propriedades semelhantes (PARK et al., 2013).

Como as frutas são utilizadas na forma de alimento, sua aplicação na área farmacêutica não é devidamente explorada. Desta forma, para aplicação nessa área é possível

a utilização das folhas e do caule para melhor aproveitamento da planta, sem prejudicar o setor alimentício em atuação.

Schafranski et al. (2019) identificaram em seus estudos 12 compostos de natureza fenólica em extrato das folhas de amoreira, entre eles, cita-se: a quercetina, a umbeliferona e o ácido cafeico, que segundo a literatura são correlacionados à ação antioxidante. Citam ainda a riqueza de micronutrientes minerais, sendo que dentre os 10 elementos determinados, o potássio, o ferro, o manganês e o magnésio apresentaram as maiores concentrações.

Os compostos fenólicos encontrados nas espécies do gênero *Morus* fazem parte da classe de compostos que conferem propriedades antioxidante e antitumoral a espécie, além disso, são responsáveis pela atividade antiinflamatória desempenhada pelos extratos (PARK et al., 2013).

Morus nigra L. é uma espécie bastante utilizada na medicina popular, sendo muitos de seus efeitos já foram comprovados por meio de estudos pré-clínicos, e outros ainda com necessidade de estudos mais aprofundados. Existem informações de uso popular da planta por mulheres no climatério, para substituir a terapêutica da reposição hormonal convencional (PADILHA et al., 2010). As folhas são empregadas externamente em gargarejos, para combater aftas e amigdalite, no combate à febre e à dor de dente. Da infrutescência é feito um xarope, utilizado em diarreias e como vermífugo, além de ser expectorante e adstringente. Em estudos recentes, foi descoberto que esse xarope possui capacidade de regulação da hiperglicemia e retardo da catarata. O xarope dos frutos também é útil no tratamento de faringites e doenças inflamatórias do trato gastrointestinal. A decocção da casca e da raiz tem efeito purgativo e vermífugo (MIRANDA et al., 2010a).

Os frutos, as folhas, as cascas e as raízes são citados como laxativo, sedativo, expectorante, refrescante, emoliente, calmante, diurético, hipoglicemiante, antisséptico, anti-inflamatório, antioxidante, emético, tônico, anti-helmíntico, bem como agente no tratamento de eczema e inflamações orais. Essas partes da planta também são usadas para o tratamento do diabetes, pois contêm substâncias como a 1-deoxinojirimicina, um alcalóide com efeito hipoglicemiante (QUEIROZ et al., 2012). A planta tem sido usada na medicina popular como antidiabético, analgésico, diurético, antitussígeno, sedativo, ansiolítico, hipotensor e anti-inflamatório (MALIK et al., 2012; PADILHA et al., 2010b), para tratamento do colesterol alto, pressão alta, reposição hormonal da mulher, e para prevenir derrames (ALBERTASSE et al., 2010). Também tem sido usada para tratamento de febre e câncer (MALLHI et al., 2014). O fruto da amoreira tem sido usado como remédio popular para o tratamento de doenças orais e dentais, diabetes, hipertensão, artrite e anemia (FAZAELI et al., 2013).

A planta é usada para tratar tosse, asma e reumatismo. A decocção das folhas possui propriedades de purificação do sangue, reduz a febre e é diurética. Extratos das folhas são conhecidos por terem atividade antibacteriana e fungicida (MAZIMBA et al., 2011). *Morus nigra* L. é amplamente usada na medicina tradicional do Brasil para o tratamento do diabetes. Na região do Vale do São Francisco, *M. nigra* é popularmente conhecida como amora-miúra, e o chá das folhas (decocto) é bastante utilizado pela população local para o tratamento de diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (OLIVEIRA et al., 2013).

A planta é usada para tratamento de inflamação, coagulante do sangue, dor de dente, e como antídoto para picadas de cobra. É usada ainda como antidiabético e diurético na medicina popular do Paquistão. Ela também pode ser usada como laxante, antidiarreico, anti-inflamatório, antirreumático e antitussígeno. Os frutos são usados na medicina popular da Turquia para tratar febre, como hepatoprotetor, diurético e para baixar a pressão sanguínea, bem como para tratamento de parasitoses, como remédio para disenteria, laxante, para dor de dente, anti-helmíntico, expectorante, hipoglicemiante e emético (ERCISLI et al., 2010).

Devido à busca constante do uso de ingredientes naturais, os extratos vegetais têm ganhado popularidade nos últimos anos. Os extratos vegetais mais comuns são os chás ou infusões de ervas. O consumo dessas bebidas é mundialmente distribuído e extremamente popular em diversos países asiáticos, sul-americanos e europeus, em virtude de vários benefícios à saúde e às funções fisiológicas (BANSAL et al., 2012).

Wu et al. (2013) reportaram que, o extrato fenólico da folha de amoreira possui a capacidade de diminuir o acúmulo de lipídios hepáticos por meio da ativação da via de sinalização da proteína quinase. Além disso, outros estudos indicaram que os extratos de folhas do mesmo gênero *Morus* poderiam ser utilizados na prevenção de doenças assinaladas por inflamações crônicas através da inibição do fator de transcrição nuclear (PARK et al., 2013) e no tratamento de diabetes tipo 2 e outras doenças cardiovasculares (JESZKA-SKOWRON et al., 2014).

2.12.1 Toxicidade de *Morus nigra* L.

Em experimentos realizados com camundongos, Almeida et al. (2011), Oliveira et al. (2013) e Costa (2018) não identificaram ocorrência de mortes dos animais tratados, nem alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados, indicando baixa ou nenhuma toxicidade de *Morus nigra* L.

Almeida-Cincotto et al. (2011) estudando *in vitro* a citotoxicidade das folhas de *Morus nigra* L. sobre linhagens celulares humanas de hepatoma (HepG2), queratinócitos (HaCat) e fibroblastos humanos (HDFa), concluíram que o extrato pode ser considerado seguro mediante a toxicidade celular.

Calazans et al. (2019) em estudo *in vivo* realizado frente à *Artemia salina*, demonstraram que as folhas de amoreira possuem baixa toxicidade ou são até mesmo atóxicas.

2.13 Modelo animal: camundongos knockout para o LDLr (LDLr -/-)

Estudos sobre aterosclerose conduzidos em humanos apresentam restrições no controle de certas variáveis. Há dificuldades no controle de fatores ambientais e, principalmente, dietéticos, os quais estão estritamente relacionados ao desenvolvimento e progressão do processo aterosclerótico, e podem comprometer os resultados de pesquisas (LI et al., 2008).

A elucidação de mecanismos envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose é pouco provável de ser verificada em humanos devido à complexidade e cronicidade do processo e, também, à impossibilidade de se caracterizar as lesões com métodos não invasivos. As dificuldades desses estudos em humanos demandam alternativas que culminam com a utilização de modelos animais, os quais são extensivamente discutidos e aceitos no meio científico, sendo confiáveis para o estudo da aterosclerose e permitindo a ampliação do conhecimento da sua patogenia e causalidades (ZADELAAR et al., 2007).

Os camundongos são animais com relativa facilidade de manutenção e utilização, entretanto, altamente resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose, sendo que não desenvolvem lesões dentro de um ano nem mesmo quando alimentados com dieta aterogênica (LI et al., 2008). Por muitos anos, camundongos não foram usados em estudos sobre aterosclerose devido à convicção de não serem um modelo apropriado, já que não respondiam uniformemente a uma dieta hipercolesterolêmica e não geravam lesões ateroscleróticas reprodutíveis (JAWIEN et al., 2004).

Assim, na década de 90, a engenharia genética permitiu o desenvolvimento de modelos de camundongos transgênicos capazes de desenvolver lesões avançadas em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (BRESLOW, 1996). Vários estudos apontam que camundongos knockout (-/-) para o LDLr podem desenvolver lesões que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (CALARA et al., 2001).

Pesquisas com camundongos LDLr^{-/-} mostraram que esses animais desenvolvem hiperlipidemia espontânea moderada, porém, são resistentes ao desenvolvimento de lesões neointimais na artéria carótida quando alimentados com dieta padrão para roedores. Entretanto, quando alimentados com dieta hiperlipídica, tornaram-se susceptíveis às lesões neointimais (TIAN et al., 2006) e apresentaram significativo estresse oxidativo arterial com desenvolvimento da placa de aterosclerose e HVE (GARCIA; INCERPI, 2008). Portanto, a dieta hiperlipídica para indução da aterosclerose no camundongo LDLr^{-/-} constitui adequado modelo experimental para o estudo das complicações cardiovasculares encontradas na aterosclerose avançada.

Há concordância de que camundongos “knockout” para o receptor de LDL (LDL r^{-/-}) podem desenvolver lesões aterogênicas que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (CALARA et al., 2001).

A deficiência dos receptores para a LDL em humanos leva à hipercolesterolemia familiar homozigótica, nos quais os níveis de LDL no plasma se aproximam de 1000 mg/dL, podendo causar um quadro de infarto agudo do miocárdio durante a segunda década de vida (FAZIO; LINTON, 2001). Já em camundongos, a deficiência para o receptor de LDLr^{-/-}, provoca apenas uma modesta hipercolesterolemia de aproximadamente 250 mg/dL, com aumento dos níveis séricos das lipoproteínas aterogênicas LDL e IDL, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas quando alimentados com dieta comercial (DAUGHERTY, 2002). Contudo, quando alimentados com dieta aterogênica, esses animais desenvolvem grave hipercolesterolemia, com níveis de colesterol entre 1000-1200 mg/dL e graves lesões ateroscleróticas ao longo da árvore aórtica (FAZIO e LINTON, 2001).

Estudos mostram que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias desenvolvem a aterosclerose, aumento de 4,7 e 1,2 vezes na concentração plasmática de colesterol e triglicérides, respectivamente, em relação aos camundongos LDLr^{-/-} com dieta padrão (KRIEGER et al., 2006). Garcia e Incerpi (2008) confirmam que estes camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias, apresentaram aumento de 30% no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparados aos camundongos alimentados com dieta padrão, além do aumento do colágeno intersticial e perivascular, fato importante que indica presença de hipertrofia cardíaca nestes camundongos. Garcia et al. (2011) mostraram que os camundongos LDLr^{-/-} desenvolveram hiperlipidemia espontânea moderada, apresentando níveis séricos da HDL elevados, o que os tornam mais resistentes ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e estresse oxidativo, comparados aos camundongos Wide Type.

Bradley et al. (2008) confirmaram que uma dieta hiperlipídica aumenta a expressão de TNF- α , e outros fatores que caracterizam o aumento do processo inflamatório no tecido adiposo de camundongos. Além disso, demonstra também que o aumento no processo inflamatório está associado a aumentos concomitantes nos níveis de insulina, leptina e glicose, reforçando a relação do processo inflamatório crônico de baixa intensidade com a RI. Em humanos também demonstrou-se que o excesso de peso (IMC > 27 kg/m²) contribui para o aumento dos níveis séricos de TNF- α , apresentando correlação inversa entre o aumento desta citocina e o metabolismo da glicose.

O aparecimento das placas ateroscleróticas nos camundongos LDLr $-/-$ KO é tempo-dependente e se inicia na aorta proximal (ZADELAAR et al., 2007). A morfologia, composição celular e localização preferencial das lesões ateroscleróticas nesses animais são documentadas na literatura científica e são semelhantes às lesões em humanos em vários aspectos, iniciando com células espumosas e estágio de estrias gordurosas, até estágios mais avançados de proliferação de cápsula fibrótica da lesão (NAITO & YOSHIKAWA, 2009).

Frente a essa similaridade, o modelo animal geneticamente modificado é aceito e extensivamente utilizado na investigação dos mecanismos aterogênicos e em estudos que buscam intervenções antiaterogênicas (LIBBY, 2008).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. P. L. Hipertrofia ventricular esquerda: implicações para a prática clínica. **Rev Bras Hipertens.** v.13, n. 4, p. 315-317, 2006.
- ALMEIDA, J. R. G. da S. Evaluation of Hypoglycemic Potential and Pre-Clinical Toxicology of *Morus nigra* L. (*Moraceae*). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 30, n. 1, p. 96-100, 2011.
- ALBERTASSE, P. D.; THOMAZ, L. D.; ANADRADE, M. A. Medicinal plants and their uses in Barra do Jucu community, Vila Velha Municipality, Espírito Santo State, Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 12, n. 3, p. 250-260, 2010.
- ALIBASIC, E. et al. Atherogenic dyslipidemia and residual vascular risk in practice of family doctor. **Med Arch.** v.69, n.5, p. 339-341, 2015.
- ALIE, N. et al. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease: PET/CT for the evaluation of atherosclerosis and inflammation. **Clin Med Insights Cardiol.** v. 8 (Supl 3), p. 13-21, 2015.
- ALMEIDA-CINCOTTO, M. G. J. **Extrato de folhas de *Morus nigra* L.: prospecção de novo ativo e sua aplicação em produto cosmetodermatológico.** 146 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Araraquara, 2016.
- ALMEIDA-CINCOTTO, M. G. J. et al. Avaliação do potencial citotóxico e do potencial em estimular a biossíntese de colágeno de extrato de folhas de *Morus nigra* L. em cultura celular. **Rev. Ciên. Farm. Básica Apl.**, v. 37, n. 1, 2016.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Rev. Virtual Quim.** v.5, n. 3, p. 450-513, 2013.
- AMMIRATI, E. et al. The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis. **Clin Exp Immunol.** v. 179, n. 2, p. 173-187, 2015.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC Nº 2, de 07 de janeiro de 2002.

BANSILAL, S.; CASTELLANO, J. M.; FUSTER, V. Global burden of CVD: focus on secondary prevention of cardiovascular disease. **Int J Cardiol.** v. 201, n. 1, p. 1-7, 2015.

BANSAL, S. et al. Pharmacological profile of green tea and its polyphenols: a review. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 11, p. 3347-3360, 2012.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

BESLER, C.; LUSCHER, T. F. LANDMESSER, U. Molecular mechanisms of vascular effects of High - density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. **EMBO Molecular Medicine.** v. 4, p. 251-268, 2012.

BHATT, H.; SAFFORF, M.; GLASSER, S. Coronary heart disease risk factors and outcomes in the twenty-first century: findings from the reasons for geographic and racial differences in stroke (REGARDS) study. **Curr Hypertens Rep.** v. 17, n. 4, p. 541, 2015.

BOTELHO, P.B. et al. Association between diet and polymorphisms in individuals with statin-controlled dyslipidaemia grouped according to oxidative stress biomarkers. **Braz J Pharm Sci**, v. 48, n. 1, p. 39-49, 2012.

BRADLEY, R. L. et al. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 295, n. 3, p. 586-594, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. **Science.** v. 272, p. 685-88, 1996.

BROWNSEY, R. W.; BOONE, A. N.; ALLARD, M. F. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. **Cardiovasc Res.** v. 34, n. 1, p. 3-24, 1997.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde coletiva.** v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

CALARA, F. et al. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. **J Pathol.** v. 195, p. 257-263, 2001.

CALAZANS, R. S. P. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade aguda frente à *Artemia salina* (Leach) de plantas comercializadas em feira-livre. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. v. 17, n. 1, 10p, 2019.

CHAMPLAIN, J. et al. Oxidative stress in hypertension. **Clin Exp Hypertens**. v. 26, n. 7 e 8, p. 593-601, 2004.

CHEN, J. S. et al. Association among fibrinolytic proteins, metabolic syndrome components, insulin secretion, and resistance in schoolchildren. **Int J Endocrinol**. 2015:170987, 2015.

COSTA, T.; JORGE, N. Compostos bioativos benéficos presentes em nozes e castanhas. **Unopar científica ciência biológicas e saúde**. v. 13(3), p. 195-203, 2011.

COSTA, J. P. L. **Efeito do extrato de *Morus nigra* L. no tratamento de sintomas vasomotores em mulheres com síndrome climatérica – um estudo randomizado, placebo – controlado**. 2018. 157 f. Dissertação (Mestrado em Saúde do adulto e da criança) – Departamento de Medicina, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

CORICA, D. et al. Could AGE/RAGE-Related Oxidative Homeostasis Dysregulation Enhance Susceptibility to Pathogenesis of Cardio-Metabolic Complications in Childhood Obesity? **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 10, p. 426, 2019.

CORTEZ-DIAS, N. et al. Comparação de diferentes definições de síndrome metabólica: implicações no risco de doença coronária e acidente vascular cerebral. **Rev Port Cardiol**. v. 30, n. 2. p. 139-169, 2011.

DALMARGO, A. P.; CAMARGO, A.; ZENI, A. L. B.; *Morus nigra* L. and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. **Metab. Brain Dis**. v. 32, n. 6, p. 1963-1973, 2017.

DANTAS DE BRITO, S. C.; RODRIGUES, W. Avaliação do marco regulatório na produção de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista de Políticas Públicas**. v. 19, n. 2, p. 531-538, 2015.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. **American Journal of the Medical Sciences**. v. 323, p.3-10, 2002.

ERCISLI, S. et al. Phytochemical content of some black (*Morus nigra* L.) and purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes. Food Technol. **Biotechnol**. v. 48, n. 1, p.102-106, 2010.

DE FRONZO R. A.; TOBIN J. D.; ANDRES R. Glucose clamp technique : a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am. J. Physiol.** v. 237, n. 3, E214-E223, 1979.

EVANS, J. L, GOLDFINE, I. D. Aging and Insulin Resistance: Just Say iNOS. **Diabetes.** v. 62, n. 2, p. 346-348, 2013.

FAZAELI, M. et al. Polyphenol contents and antioxidant activity of five fresh fruit *Morus spp.* (Moraceae) extracts. **Agro Food Industry HiTech.** v. 24, n. 5, p. 34-37, 2013.

FAZIO, S.; LINTON, M.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Front. Biosci.** v. 6, p. 515-525, 2001.

FIGUEREDO, C. A. et al. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva** [online]. v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FORSTEMANN, U. MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation.** v. 113, n. 13, p. 1708- 1714, 2006.

GARCIA, J. A. D.; INCERPI, E. K. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 90, n. 6, p. 443-450, 2008 .

GARCIA, J. A. D. et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de cmundongos hiperlipidêmicos. **Rev Port. Cardiol.** v.30, n.10,p.763-769, 2011.

GAYOSO-DIZ, P. et al. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. **BMC Endocrine Disorders.** v.13, p. 47-56,2013.

GELONEZE, B. et al. Índices HOMA1-IR e HOMA2- IR para identificação de resistência à insulina e síndrome metabólica - Estudo Brasileiro de Síndrome Metabólica (BRAMS), **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 53, n. 2, p. 281-287, 2009.

GREMMEL, T. et al. Interleukin-6 and asymmetric dimethylarginine are associated with platelet activation after percutaneous angioplasty with stent implantation. **PLoS One.** v. 10, n. 3, p. 10193-10202, 2015.

GONDIM, T. M. et al. da S. Aspectos fisiopatológicos da dislipidemia aterogênica e impactos na homeostasia. **Rev. Bras. An. Clin.** v. 49, n. 2, p. 120-126, 2017

GURURAJAN, P.; GURUMURTHY, P.; NAYAR, P. Increased serum concentrations of Soluble CD40 Ligand as a prognostic marker in patients with Acute Coronary Syndrome. **Indian J Clin Biochem.** v. 24, n. 3, p. 229-233, 2009.

GYLLING, H., et al. Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. **Atherosclerosis.** v. 232, n. 2, p. 346-360, 2014.

HASHIMOTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Identification and characterization of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. **Food Science and Technology International.** v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.

HEIN, T. W. et al. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. **Atherosclerosis.** v. 206, n. 1, p. 61-68, 2009.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. (Review) **Cell.** v. 140, n. 6, p. 900-917, 2010.

IBIAPINA, W. V. et. al. Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do sus. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança.** v. 2, n.1, p. 58-68, 2014.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. **J Physiol Pharmacol.** v. 55, n. 3. p. 503- 517. 2004.

JESZKA-SKOWRON, M. et al. Mulberry leaf extract intake reduces hyperglycemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed high-fat diet. **Journal of Functional Foods.** v. 8, p. 9-17, 2014.

JUNG, U. J.; CHOI, M. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences.** v. 15, n.4, p.6184-6223, 2014.

KATSUBE, T. et al. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. **Food Chemistry.** v. 113, p. 964-969, 2009.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiol Res Pract.** v. 2014, p.1-21, 2014.

KANNEL, W. B. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. **Am J Med.** v. 75, n. 3, p. 4-11, 1983.

KRIEGER, M. H. et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. **Nitric Oxide.** v. 14, p. 12-20, 2006.

LI, Q. et al. Quantitative Trait Locus Analysis of Carotid Atherosclerosis in an Intercross Between C57BL/6 and C3H Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Stroke.** v. 39. p. 166-173. 2008.

LIBBY, P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. **J Intern Med.** v. 263. p. 517-527. 2008.

MACEDO, L. E. T. de.; FAERSTEIN, E. Cholesterol and prevention of atherosclerotic events: limits of a new frontier. **Rev. Saúde Pública.** v. 51, n. 2, 2017 .

MAGALHAES, F. J. et al . Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de enfermagem: estratégias de promoção da saúde. **Rev. bras. enferm.** v. 67, n. 3, p. 394-400, 2014 .

MALIK, M. N. H. et al. Phytochemical analysis and cardiac depressant activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* L. L. fruit. **J. Appl. Pharm. Sci.** v. 2, n. 12, p. 39-41, 2012.

MALLHI, TH. et al. Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* L. against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. **Bangladesh J. Pharmacol.** v. 9, p. 60-66, 2014.

MARANHÃO, P. A. et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Nutr Metab,** v. 8, n. 32, p. 1-8, 2011.

MATOS, M. A. **O Efeito Do Treinamento Intervalado De Alta Intensidade Emcomponentes Celulares E Moleculares Relacionados Á Resistência À Insulina Em Indivíduos Obesos.** 2016. 145 f. Tese (Doutorado - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

- MATHIAS JR. W. **Manual de ecocardiografia**. Barueri (SP): Manole; 2007. p. 39-43, 2007.
- MATSUOKA, H. Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in humans. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 54 n. 2, p. 65-72, 2001.
- MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia.** v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.
- MAZIERO, M.; PINHEIRO TEIXEIRA, M. A expansão da utilização de fitoterápicos no Brasil. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 9, n. 2, 2017.
- MAZIMBA, O; MALINDA, R. R. T.; MOTLHANKA, D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.** v. 5, n. 6, p. 751-754, 2011.
- MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista.** v. 36, n. 1, p. 61-68, 2010.
- MOTTA, N. A. V. da. et al. Aterosclerose: Novos Biomarcadores e Perspectivas Terapêuticas. **Rev Bras Cardiol.** v. 26, n. 5, p. 390-99, 2013.
- MULÈ, G. et al. Metabolic syndrome in hypertensive patients: An unholy Alliance. **World J Cardiol.** v.6, p.890- 907, 2014.
- NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Green tea and heart health. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 54. p. 385-390. 2009.
- NOWOTNY, K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules.** v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015.
- OHKUMA, T.; IWASE, M.; FUJII, H. et al. Dose- and time-dependent association of smoking and its cessation with glycemic control and insulin resistance in male patients with type 2 diabetes mellitus: the fukuoka diabetes registry. **PLoS One.** v. 10, n. 3, 2015.
- OLIVEIRA, A. C. B. et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

OLIVEIRA, G. A. et al. Hábitos alimentares e risco de doenças cardiovasculares em universitários. **Medicina** (Ribeirão Preto. Online). v. 47, n. 4, p. 399-405, 2014. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/89593>>. Acesso em 20/09/2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Brasil e OPAS/OMS. Disponível em: <<https://www.paho.org/bra>>. Acesso em 20/09/2019.

PADILHA, M. M. et al. Pharmacobotanical study of the leaves of blackberry, *Morus nigra*, Moraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 621-626, 2010a.

PADILHA, M. M. et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* L. leaves. **Phytother. Res.** v. 24, p. 1496-1500, 2010b.

PAMUKCU, B. et al. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. **Ann Med.** v. 43, n. 5, p. 331-340, 2011.

PARK, E. et al. Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF-kappa B. **Journal of Functional Foods.** v. 5, n. 1, p. 178-186, 2013.

PIEPOLI, M. F., et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). **Eur Heart J.** v. 37, n. 29, p. 2315-2381, 2016.

PIRES, A. et al. Insulin Resistance, Dyslipidemia and Cardiovascular Changes in a Group of Obese Children. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 104, n. 4, p. 266-273, 2015.

PONTES, A. G. et al. Resistência à insulina em mulheres com síndrome dos ovários policísticos: relação com as variáveis antropométricas e bioquímicas. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 34, n. 2, p. 74-79, 2012.

PODREZ, E. A. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v.37, n.7, p. 719-725, 2010.

QUEIROZ, G. T. et al. Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. **Food Chem Toxicol.** v. 50, n. 3, p. 816-822, 2012

RADDY, M. M. DEVAVARAM, J. D.; DHAS, J.; ADEGHATE, E et al. Anti-hyperlipidemic effect of methanol bark extract of Terminalia chebula in male albino Wistar rats. **Journal of Pharmaceutical Biology**. v.53, n. 8, p. 1133-1140, 2015.

RAMACHANDRAN, A. et al. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Radic Biol Med*. v. 33, n. 11, p. 1465-1434, 2002.

RAMOS, A. M. et al. Inflammatory markers of cardiovascular disease in the elderly. **Arq Bras Cardiol**. v. 92, p. 221-228, 227-234, 2009.

REINER, Z. et al; European Association for Cardiovascular Prevention Rehabilitation. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias the Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). **Eur Heart J**. v. 32, n. 14, p. 1769-1818, 2011.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**. v. 362, n. 6423, p. 801-809, 1993.

SÁ, K. M. **A repercussão da política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos na formação superior em saúde no estado do ceará entre 2006 e 2016**. 2016. 213 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Políticas Públicas e Gestão da Educação Superior). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**. v. 100(1 Supl 3), p. 1-40, 2013.

SANTOS, L. dos. **Influência do leite de soja e do extrato etéreo de Capsicum baccatum na lesão aterosclerótica e no remodelamento cardíaco em camundongos knockout para o receptor de LDL**. 2015. 72 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. 2015.

SBC. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. In: Arquivos Brasileiros de Cardiologia. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. p. 01-22, 2013.

SDB. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015/**Sociedade Brasileira de Diabetes**; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

SCHAFRANSKI, K. et al . AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA PRETA (*Morus nigra*

L.) UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. **Quím. Nova.** v. 42, n. 7, p. 736-744, 2019 .

SILVA, R. M.. **Associação da Resistência à Insulina, Estresse Oxidativo e Estado Nutricional de Vitamina E em Indivíduos com Síndrome Metabólica com o Genótipo PRO12PRO no PPAR γ 2.** 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Nutrição – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

SILVA, D. da C; CERCHIARO, G; HONORIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quím. Nova.** v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011 .

SIMAO, AF et al . I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 101, n. 6, supl. 2, p. 1-63, 2013

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. **Revista Da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** v. 109, n. 1, 2017.

SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO MANUAL DE PREVENÇÃO CARDIOVASCULAR - **SOCERJ.** [Editores: Ricardo Mourilhe Rocha, Wolney de Andrade Martins]. --1. ed. -- São Paulo: Planmark; Rio de Janeiro, 2017.

SOUZA, M. F. M et al. Tendências do risco de morte por doenças circulatórias nas cinco regiões do Brasil no período de 1975 a 1996. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia,** v.77, n.6, p.562-568, 2007.

SMITHIES, O.; MAEDA, N. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. **Proc Natl Acad Sci.** v. 92, n. 12, p. 5266–5272, 1995.

STANGL, V.; LORENZ, M.; STANGL, K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. **Mol Nutr Food Res.** v. 50, n. 2, p. 218-228, 2006.

STEVENS, B. et al . Os Custos das Doenças Cardíacas no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 111, n. 1, p. 29-36, July 2018 .

TCHERNOF, A.; DEPRÈS, J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiol Rev.** v. 93, p. 359-404, 2013.

TEIXEIRA, B. C. et al. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **J Vasc Bras.** v. 13, n. 2, p. 108-115, 2014.

TIAN, J. et al. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 345, n. 3, p. 1004-1009, 2006.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Principles of anatomy and physiology.** 12th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2009.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. **Rev Bras Hipertens.** v. 14, n. 4, p. 269-274, 2007.

VIEIRA, E.A. et al. Razão triglicérides/HDL-C e proteína C reativa de alta sensibilidade na avaliação do risco cardiovascular. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.47, n.2, 2011.

VOLP, A. C. P.; ALEFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 52, n. 3, p. 537-549, 2008.

XAVIER, H. T. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol.** v.101, n. 4, Supl. 1, p. 1-20, 2013.

WENZEL, F. et al. Different behavior of soluble CD40L concentrations can be reflected by variations of preanalytical conditions. **Clin Hemorheol Microcirc.** v. 39 (1-4), p. 417-422, 2008.

WINK, M. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification. Academic Press: **Encyclopedia of Evolutionary Biology.** Ed. 1, p. 2132, 2016.

WIKINSKI, R. et al. Lipoproteínas remanentes aterogénicas en humanos. **Medicina.** v. 70, n. 4, p. 375-380, 2010.

WITZTUM, J. L.; LICHTMAN, A. H. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. **Annual review of pathology.** v. 9, p. 73-102, 2014.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. **Heart Fail.** v. 7, n. 4, p. 317-325, 2002.

WU, C. H.; CHEN, S. C.; OU, T. T.; CHYAU, C. C.; CHANG, Y. C.; WANG, C. J. Mulberry leaf polyphenol extracts reduced hepatic lipid accumulation involving regulation of adenosine monophosphate-activated protein kinase and lipogenic enzymes. **Journal of Functional Foods.** v. 5, p. 1620-1632, 2013.

ZADELAAR, S. et al. Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. **Arterosc Thromb Vasc Biol.** v. 27. p. 1706- 1721. 2007.

ZANG, Y. et al. Anti-Diabetic, Anti-Oxidant and Anti- Hyperlipidemic Activities of Flavonoids from Corn Silk on STZ-Induced Diabetic Mice. **Molecules.** v. 21, n. 7, p. 1-11, 2016.

CAPÍTULO 2

Efeito do extrato das folhas de amoreira (*Morus nigra* L.) no processo inflamatório cardiovascular e na resistência insulínica de camundongos dislipidêmicos

Effect of mulberry leaf extract (*Morus nigra* L.) on cardiovascular inflammatory process and insulin resistance of dyslipidemic mice

Carlos Roberto Pereira¹; Ana Luísa Cabral de Faria²; Maria das Graças de Souza Carvalho²;
Brígida Monteiro Vilas Boas¹; Erika Kristina Incerpi Garcia³; Fabiana Lucio de Oliveira¹;
Leandro dos Santos⁴; Lais Roncato de CarvalhoAlves²; Aline Manke Nachtigall¹; Flávia
Helena Pereira⁵; José Antonio Dias Garcia^{1,2}

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais –Machado,
Brasil.

²Universidade José do Rosário Vellano – Alfenas, Brasil.

³Universidade Federal de Alfenas – Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco – Serra Talhada, Brasil.

⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais –Machado,
Brasil.

Resumo

Introdução: As folhas de *Morus nigra* L. são abundantes e possuem agentes bioativos como os compostos fenólicos, com diversas ações biológicas como antioxidante, bactericida e anti-inflamatória. Estudos com as folhas da amoreira mostraram efeito anticarcinogênico, hipoglicemiante e antiobesidade. **Objetivo:** Avaliar o efeito do extrato das folhas da amoreira na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e na hipertrofia ventricular esquerda de camundongos dislipidêmicos. **Material e métodos:** Camundongos knockout para o gene do receptor LDL foram divididos em quatro grupos experimentais (n=20): grupo S (Standard), alimentados com dieta padrão; grupo SA (Standard /Amoreira), alimentados com dieta padrão e extrato das folhas da amoreira; grupo HL (Hyperlipidic), alimentados com dieta hiperlipídica e grupo HLA (Hyperlipidic/Amoreira), alimentados com dieta hiperlipídica e extrato das folhas da amoreira. Após 15 dias de experimento, foi coletado plasma e quantificado os níveis plasmáticos de colesterol total e suas frações, triglicerídeos, proteína C

reativa, insulina, glicose e calculado o índice de Homa. Foram coletados tecidos cardíacos e da parede da aorta para quantificar a expressão do CD40L pelo método de western blotting. Lâminas histológicas com tecido cardíaco foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina, para avaliação histológica geral, e coradas com picrosírius red para avaliar a área de depósito de colágeno. **Resultados:** O extrato das folhas de amoreira elevou o HDL plasmático, preveniu moderadamente a hipercolesterolemia e não reduziu a hipertrigliceridemia nos camundongos do grupo HLA; preveniu a resistência à insulina e, conseqüentemente a hiperinsulinemia; reduziu o nível plasmático de PCR e preveniu o aumento da expressão do CD40L. **Conclusão:** O tratamento com o extrato das folhas de amoreira preveniu a inflamação cardiovascular e a resistência insulínica, reduzindo dessa forma, o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda.

Palavras chave: Dislipidemia; Inflamação cardíaca; Aorta; Insulina; Amora.

Introdução

A síndrome metabólica (SM) é um conjunto de alterações metabólicas que representa um grande problema de saúde pública em todo o mundo, tendo em vista que eleva os índices de morbimortalidade por doenças cardiovasculares. Entre essas alterações, estão a resistência à insulina (RI), dislipidemia e *diabetes mellitus* tipo 2 (CORICA et al., 2019).

A dislipidemia genética associada à dieta hiperlipídica, é um distúrbio metabólico envolvido na trílogia: processo inflamatório, disfunção endotelial (OISHI et al., 2018) e estresse oxidativo (CARVALHO et al., 2015), do ambiente cardiovascular, sendo considerado os denominadores comuns entre as condições que promovem e apoiam a aterogênese (BARBALHO et al., 2015), hipertrofia cardíaca e a resistência insulínica (SARTO et al., 2018).

A resistência insulínica é caracterizada pela diminuição na ação da insulina nos tecidos periféricos, o que resulta em um aumento compensatório da secreção de insulina. A desarmonia desse mecanismo ocasiona gradativamente a intolerância à glicose, que pode resultar no surgimento de alterações hemodinâmicas e metabólicas, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Isso mostra que, possivelmente, as alterações fisiopatológicas dessa doença estejam presentes vários anos antes de sua expressão clínica (GAYDOSO-DIZ et al., 2013). O estresse oxidativo gerado pela dislipidemia (SARTO et al., 2018), assim como a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias (CASTILLO-HERNANDEZ et al., 2017) estão

envolvidas na patogênese da resistência insulínica e muitas estratégias anti-inflamatórias demonstraram melhorar a sensibilidade à insulina (OLIVEIRA et al., 2016).

A dislipidemia causa ainda outros distúrbios que desencadeiam alterações morfofuncionais em diversos órgãos por diferentes vias. Dentre essas vias, temos a via CD40/CD40L, no qual o ligante CD40L, pode se apresentar na forma livre ou solúvel, ou como uma proteína transmembrana, que compõe uma via fisiopatológica intimamente envolvida na inflamação da parede vascular (STORCH et al., 2017) e cardíaca (OISHI et al., 2018); na via aterogênese (SILVA, 2015) e na via hipertrofia ventricular esquerda, cuja inibição da via de sua sinalização pode efetivamente reduzir a aterosclerose e a hipertrofia ventricular esquerda em camundongos (SANTOS et al., 2017).

O tratamento da hipercolesterolemia deve incluir medidas não farmacológicas. O padrão alimentar deve ser resgatado por meio do incentivo à alimentação saudável, juntamente da orientação sobre a seleção dos alimentos, o modo de preparo, a quantidade e as possíveis substituições alimentares, sempre em sintonia com a mudança do estilo de vida (FALUDI et al., 2017), que estão recomendadas para todos os pacientes, assim como o uso da terapia farmacológica que pode ser indicada em situações específicas. As drogas disponíveis atualmente para o tratamento da hipercolesterolemia incluem as estatinas (inibidores da coenzima A), a ezetimiba (inibidor seletivo da absorção do colesterol) e as resinas ou sequestradores dos ácidos biliares (SILVERMAN et al., 2016). Entretanto, existem limitações no uso desses medicamentos, e seus efeitos colaterais, tais como insuficiência hepática e renal, diarreia e hipoglicemia, o que fazem esses medicamentos intoleráveis para alguns pacientes que necessitam administrá-los. Dessa forma, a busca por novas alternativas que visam encontrar novos compostos que aumentem a eficácia e que apresentem reduzida ou nenhuma toxicidade, evolui cada vez mais, incentivando no desenvolvimento de novas pesquisas que busquem alternativas em compostos naturais (ZHANG et al., 2015).

A espécie *Morus nigra* L., conhecida popularmente como amoreira, amoreira-negra ou amora-preta trata-se de uma planta natural da Ásia, originária do Irã (CHEN et al., 2016). Essa espécie vegetal foi trazida para o Brasil por imigrantes japoneses, adaptando-se bem às condições de clima e solo (SOUZA et al., 2015). Suas folhas são abundantes e possuem agentes bioativos como os compostos fenólicos e são usadas na fitoterapia clássica como antimicrobianas, anti-alérgicas, efeitos antidepressivos, neuroprotetoras (DALMAGRO; CAMARGO; ZENI, 2017) e antioxidante (TURGUT et al., 2016; DALMAGRO; CAMARGO; ZENI, 2017). Estudos com as folhas da amoreira mostraram efeito

anticarcinogênico (COSTA, 2017), hipoglicemiante (JUNIOR et al., 2017) e anti-obesidade (CASARIN; MENDES; LOPES, 2016). Além de serem utilizadas na medicina tradicional, também está sendo usada como alimento humano (ARAUJO et al., 2015).

Os polifenóis não nutricionais, como os flavonoides, vêm exercendo poderosos efeitos antioxidantes em sistemas biológicos e na proteção cardiovascular (AGHABABAEI et al., 2015). A abordagem de opções alternativas na prevenção das dislipidemias é de extrema relevância, uma vez que esse distúrbio metabólico é considerado um problema de saúde pública. Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito do extrato das folhas da amoreira na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e na hipertrofia ventricular esquerda em camundongos dislipidêmicos.

Materiais e métodos

Preparação do extrato

As folhas de *Morus nigra* L. foram coletadas no período da manhã à temperatura de $18^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$ no município de Alfenas, Minas Gerais, no mês de agosto de 2019. O material coletado foi transportado até o laboratório da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) e imediatamente higienizado antes da desidratação. As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçado (Fanem, 320-SE) com temperatura regulada para $50^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ conforme recomendado por Schafranski et al. (2019). Em seguida, as folhas foram moídas em moinho analítico (Quimis®, São Paulo, Brasil) e armazenadas protegidas da luz, em tubos do tipo falcon escuros, e mantidas em temperatura de $-6^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ até o momento da extração.

Para a obtenção do extrato, as folhas foram submetidas à extração em solução hidroalcoólica (70% de álcool etílico e 30% de água destilada), durante 24 horas, em percolador. Em seguida foi realizada a filtração a vácuo e os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador a temperatura máxima de 40°C até a máxima retirada do etanol. Todos os processos foram realizados ao abrigo da luz. O preparo do extrato hidroalcoólico foi baseado no método descrito por Almeida et al. (2012). O extrato concentrado obtido, de coloração verde-escura e cheiro adocicado, foi dissolvido em água filtrada, até atingir a concentração de 150 mg/mL. O teor alcoólico da dissolução final foi de 0 °GL (IAL, 2008).

Protocolo experimental

O experimento foi realizado no biotério da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS). Foram utilizados 80 camundongos knockout para o gene receptor de LDL (LDLr -/-) gerados a partir do background C57BL6. Animais machos, com 3 meses, pesando 22 ± 3 g, provenientes do “Jackson Laboratory” (Bar Harbor, ME) mantidos sob condições controladas de temperatura ($22^\circ \pm 1$ °C) e ciclos de 12 horas de luz e escuro. Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFENAS, sob protocolo nº 21A/2008. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais (n=20): Grupo S, alimentados com dieta padrão (Nuvital®); Grupo SA, alimentados com dieta padrão (Nuvital®) e tratados com extrato da folha de amoreira (EFA) na dose diária de 0,064g/kg via gavagem; Grupo HL, alimentados com dieta hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico; e Grupo HLA, alimentados com dieta hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido cólico, e tratados com EFA na dose diária de 0,064g/kg via gavagem. Todos os animais receberam água *ad libitum* e sua respectiva dieta por 15 dias.

Após 15 dias com a respectiva alimentação, os camundongos permaneceram por jejum de 12 horas e a seguir foram anestesiados com xilazina e cetamina intraperitoneal (Bayer AS e Parke-Davis®, nas concentrações de 10 e 100 mg/kg, respectivamente). O sangue foi coletado por punção do plexo venoso retro-orbital para análise de glicose plasmática, insulina, triglicérides, colesterol total (CT) e suas frações (LDL, HDL e VLDL). A toracotomia foi realizada, o coração e a aorta foram removidos.

Análise do plasma

O plasma foi obtido por centrifugação do sangue a 3000 rpm por 10 minutos. A glicose plasmática foi mensurada por colorimetria enzimática, utilizando a técnica proposta por Trinder (1969). A insulina plasmática foi medida com kit comercial ELISA (Dako Ltd, High Wycombe, Bucks, Reino Unido). A avaliação do modelo de homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculada pela fórmula: insulinemia em jejum ($\mu\text{U/L}$) x glicemia

em jejum (nmol/L)/22,5* (* Para obter valores de glicose em mmol/l, multiplicar os mg/dl por 0,05551).

Ensaio enzimático foram utilizados para medir os lipídeos plasmáticos (triglicérides, colesterol total e HDL), conforme descrito por Hedrick et al. (2001). O LDL foi determinado pela fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVI; FREDRICKSON, 1972) e o VLDL usando o método descrito por Tian et al. (2006).

A determinação quantitativa da concentração sérica da proteína C reativa (PCR) foi através de turbidimetria e fotometria do soro sanguíneo (Aparelho Humastar 300®) expressando-se os resultados em mg/dL (LIMA et al., 2005).

Análises histológicas e imuno-histoquímicas

O ventrículo esquerdo (VE) foi pesado e a relação peso/peso corporal do VE foi calculada como a relação entre peso corporal (g) e VE (mg). Os camundongos foram anestesiados e seus corações foram perfundidos *in situ* com Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) seguido por 10% de formaldeído tamponado com PBS. O VE e a aorta foram mergulhados em formaldeído a 10% por pelo menos 2 dias e depois lavados em álcool 70% e processados para inclusão em parafina por métodos padrão; foram realizados cortes histológicos em série de 3 µm e fixadas em lâminas. Algumas das secções foram coradas com hematoxilina-eosina para medições dos cardiomiócitos, e outras foram coradas com vermelho picrosírius para avaliação qualitativa e quantitativa do depósito de colágeno usando luz normal (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Os colágenos intersticiais aparecem como um depósito vermelho com coloração picrosírius red.

Outras secções ventriculares e da aorta foram usadas para avaliar imuno-histoquimicamente a expressão de CD40L. As secções ventriculares e da aorta foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% para bloquear a atividade endógena da peroxidase e os locais não específicos foram bloqueados com leite desnatado a 2% diluído com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1M a pH 7,4. As secções foram incubadas por 12 horas com anticorpo policlonal de coelho CD40L (diluição 1:50; Santa Cruz Biotecnologia) em uma câmara umidificada. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado (kit Dako® LSAB⁺) por uma hora a 37° C. Para mostrar áreas imunorreativas, as secções foram incubadas com complexo conjugado com peroxidase (Dako® LSAB⁺) por 45 minutos a 37° C e colocadas em uma solução de cromogênio (DAB 50 mg em 50 ml de PBS com 3 ml de peróxido de hidrogênio a 10%) por

três minutos. Após coloração com hematoxilina Harris (Sigma®) por 25 segundos, as lâminas foram montadas e analisadas por microscopia óptica usando o software LGMC-image versão 1.0 (ARMSTRONG et al., 1998).

O software LGMC-image VS 1.0, programado para reconhecer cores e tons distintos, foi usado para destacar pixels de uma cor específica ou especificar tons no campo. O software destacou uma cor específica dentro do campo (com base nas configurações de limite do operador) e calculou a área ocupada. Os espaços não tecidos do campo foram reconhecidos (com configurações de limiar do operador) pelo software e subtraídos para fornecer a área correta de tecido total no campo. A razão entre a área de depósito de colágeno e a área total de tecido (x100%) foi então calculada para fornecer uma medida da área percentual. A porcentagem média foi representada pela média de 11 campos de cada seção histológica. Em outra análise, o diâmetro dos cardiomiócitos dentro do campo foi medido usando critérios padrões. Uma linha perpendicular ponto a ponto foi colocada através do eixo longitudinal do miócito no nível do núcleo, e esse diâmetro foi medido pelo software de imagem por computador. Todos os cardiomiócitos longitudinalmente direcionados com uma borda celular distinta (no nível do núcleo) dentro do campo de amostragem foram medidos e suas médias foram calculadas para fornecer um diâmetro médio dos cardiomiócitos. Cardiomiócitos transversais ou oblíquos foram excluídos. Foram analisados 5 cortes transversais diferentes e completos por ventrículo, que produziram de 15 a 20 medidas de cardiomiócitos por seção histológica. As medições totais foram de 75 a 100 cardiomiócitos por animal. Um único examinador realizou as análises histológicas em esquema duplo-cego (ARMSTRONG et al., 1998).

Análise de proteínas Immunoblotting

Os tecidos do VE e da aorta dos camundongos foram pulverizados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando um pilão e argamassa de aço inoxidável e ressuspensos em tampão de homogeneização da seguinte composição: Tubos 0,1 mM, 5 mM MgCl_2 , 5 mM EDTA, Triton X100 a 0,5% (vol/vol), 20% de glicerol (vol/vol) e mistura de inibidores de protease (Complete, Roche Applied Science). As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm e o sobrenadante foi coletado e analisado quanto à concentração total de proteínas usando o método de Bradford (Bio-Rad). Quantidades iguais de proteína (200 mg/faixa) de 3 ventrículos esquerdos e 5 aorta de cada grupo foram envolvidas em 7,5% (peso/vol) de mini géis de SDS polacrilamida

(Mini- Protean III, Bio-Rad) e transferidas para a membrana de nitrocelulose (Amersham Biociências). As transferências foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (p/vol) (maravilha) em tampão contendo Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), NaCl 10 mM e Tween 20 (20%, p/vol) e incubadas durante a noite com anticorpos de coelho contra anticorpos CD40L (diluições de 1: 1000). Então, colorações apropriadas controles (GAPDH) foram processadas. As manchas foram expostas ao anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de rábano silvestre (1:2000, Santa Cruz Biotecnologia), e a imunorreatividade foi visualizada usando um filme de auto-radiografia (GARCIA; INCERP, 2008). As intensidades da banda foram quantificadas por densitometria óptica das auto-radiografias desenvolvidas.

Anticorpos, Medicamentos e Reagentes

Anticorpos policlonais anti-coelho anti-CD40L foram obtidos da Santa Cruz Biotecnologia (Santa Cruz, CA), Sirius red da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) e hematoxilina, eosina, e a parafina histosec para análises histológicas foram da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

Todos os outros produtos químicos de grau de reagente eram da Sigma Chemical Co.

Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). A análise de variância (ANOVA) foi seguida pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Resultados

Na análise do perfil lipídico, os camundongos do grupo SA apresentaram aumento nos níveis plasmáticos do CT, nas suas frações e dos triglicérides quando comparados com parâmetros dos camundongos do grupo S (Tabela 1). Assim, como houve um aumento de 34% da fração HDL nos camundongos do grupo SA, as relações CT/HDL e LDL/HDL não apresentaram diferenças entre os grupos S e SA.

TABELA 1: Níveis plasmáticos do colesterol total (CT) e suas frações (HDL, LDL, VLDL) e triglicérides (TG) (mg/dL); proporções CT/HDL, LDL/HDL e TG/HDL; dos níveis plasmáticos de glicose ($\mu\text{U/L}$), insulina ($\mu\text{U/L}$) e índice de HOMA (HOMA_{IR}) e níveis plasmáticos da proteína C reativa (PCR) (mg/dL) de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta padrão (S), dieta hiperlipídica (HL) e tratados com extrato da folha da amoreira (SA e HLA).

Parâmetros	Grupo S (n=10)	Grupo SA (n=10)	Grupo HL (n=10)	Grupo HLA (n=10)
CT	249±16 ^c	326±22 ^b	631±32 ^a	418±29 ^b
HDL	59±2 ^b	79±5 ^a	25±2 ^c	75±4 ^a
CT/HDL	4,2±0,5 ^b	4,1±0,6 ^b	2,2±4,5 ^a	5,8±1,5 ^b
LDL	165±9 ^d	214±12 ^c	578±6 ^a	306±27 ^b
LDL/HDL	2,8±0,6 ^b	2,7±0,02 ^b	23,1±3,6 ^a	4,1±0,8 ^b
VLDL	25±1 ^b	33±2 ^a	28±1 ^b	37±3 ^a
TG	124±6 ^c	165±10 ^a	142±7 ^b	188±15 ^a
TG/HDL	2,1±0,2 ^b	2,1±0,4 ^b	5,9±1 ^a	2,5±0,6 ^b
Insulina	2,7±0,6 ^b	2,8±0,2 ^b	5,8±0,9 ^a	3,0±0,2 ^b
Glicose	5,5±0,1 ^a	5,6±0,3 ^a	5,6±0,1 ^a	5,5±0,2 ^a
HOMA _{IR}	0,7±0,05 ^b	0,8±0,06 ^b	1,5±0,28 ^a	0,8±0,16 ^b
PCR	6±0,5 ^b	4,5±1 ^b	14,5±1 ^a	5,5±1 ^b

Os valores foram expressos como média ± Erro Padrão da Média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Os camundongos do grupo HL apresentaram hiperlipidemia severa, com redução drástica dos níveis do HDL em relação aos grupos S, SA e HLA (Tabela 1). O tratamento com o extrato da folha da amoreira nos camundongos do grupo HLA preveniu a hiperlipidemia severa, reduzindo os níveis plasmáticos do CT e da fração LDL. Além disso, triplicou a fração HDL quando comparados com os camundongos do grupo HL, com marcada redução da relação LDL/HDL quando comparado ao grupo HL (Tabela 1). O extrato da folha da amoreira não preveniu a hipertrigliceridemia nos camundongos dos grupos SA e HLA (Tabela 1).

No perfil glicêmico e insulinêmico, os camundongos do grupo SA não apresentaram diferenças quanto ao nível plasmático de glicose e insulina e ao índice de Homa (HOMA_{IR}) quando comparados com o grupo S. Os camundongos do grupo HL apresentaram marcado aumento no nível plasmático de insulina e do HOMA_{IR} quando comparados com os grupos S, SA e HLA. O extrato da folha da amoreira preveniu o aumento dos níveis plasmáticos da insulina e do HOMA_{IR} nos camundongos do grupo HLA (Tabela 1).

Com relação aos níveis plasmáticos da proteína C reativa, observamos uma relação inversa com os níveis plasmáticos de HDL, mostrando que os níveis plasmáticos dessa

proteína aumentaram nos camundongos do grupo HL quando comparados aos dos grupos S, SA e HLA (Tabela 1).

Tabela 2:

Proporção do peso ventricular esquerdo (mg)/peso corporal do camundongo (g) (VE/PC); diâmetro dos cardiomiócitos e área miocárdica do colágeno (%) de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com: dieta padrão (S), dieta hiperlipídica (HL) e tratados com extrato da folha da amoreira (SA e HLA).

Parâmetros	Grupo S (n=10)	Grupo SA (n=10)	Grupo HL (n=10)	Grupo HLA (n=10)
Proporção VE/PC (mg/g)	3,3±0.1 ^c	3,3±0.2 ^c	4,2±0.2 ^a	3,8±0.3 ^b
Diâmetro dos cardiomiócitos (µm)	19±1 ^c	18±2 ^c	26±1 ^a	22±1 ^b
Área de colágeno miocárdica (%)	4,3±0.5 ^c	4,8±0.3 ^c	10,6±0.7 ^a	6,8±0.6 ^b

Os valores foram expressos como média ± Erro Padrão da Média. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05).

Os camundongos do grupo HL desenvolveram hipertrofia ventricular esquerda (HVE) (Tabela 2 e Figura 1) decorrente do aumento no diâmetro dos cardiomiócitos e na deposição de colágeno intersticial. Isso em resposta ao processo inflamatório, caracterizado pelo aumento da expressão do CD40L cardíaco e vascular (Figuras 2 e 3).

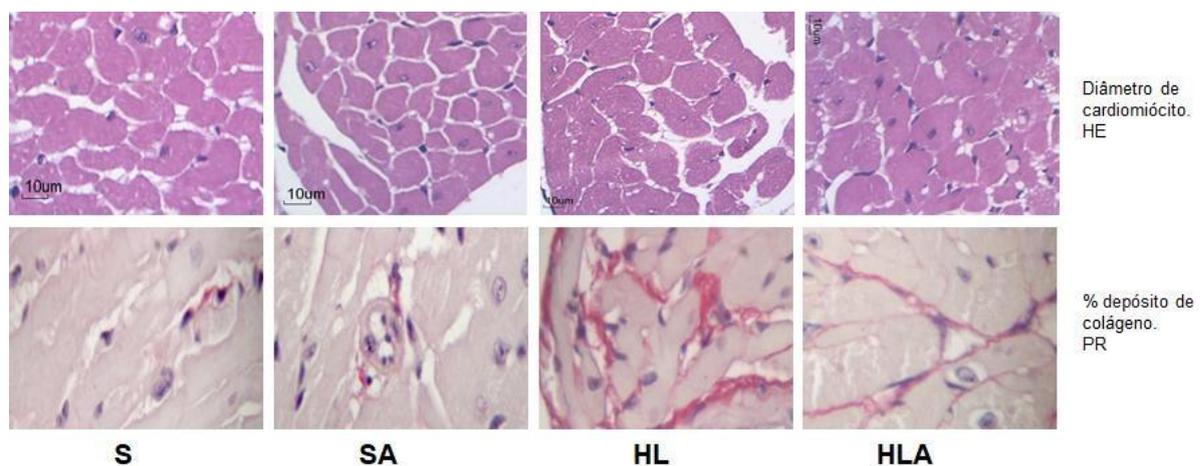


Figura 1: Fotomicrografia corada com hematoxilina/eosina (HE) representativa do ventrículo esquerdo mostrando o diâmetro dos cardiomiócitos. Fotomicrografia corada com picosirius red (PR) mostrando a distribuição do colágeno intersticial (marcado em vermelho) no miocárdio ventricular esquerdo dos camundongos. S - dieta padrão; SA - dieta padrão e extrato das folhas de *Morus nigra* L. HL - dieta hiperlipídica; HLA - dieta hiperlipídica e extrato de folha de *Morus nigra* L.

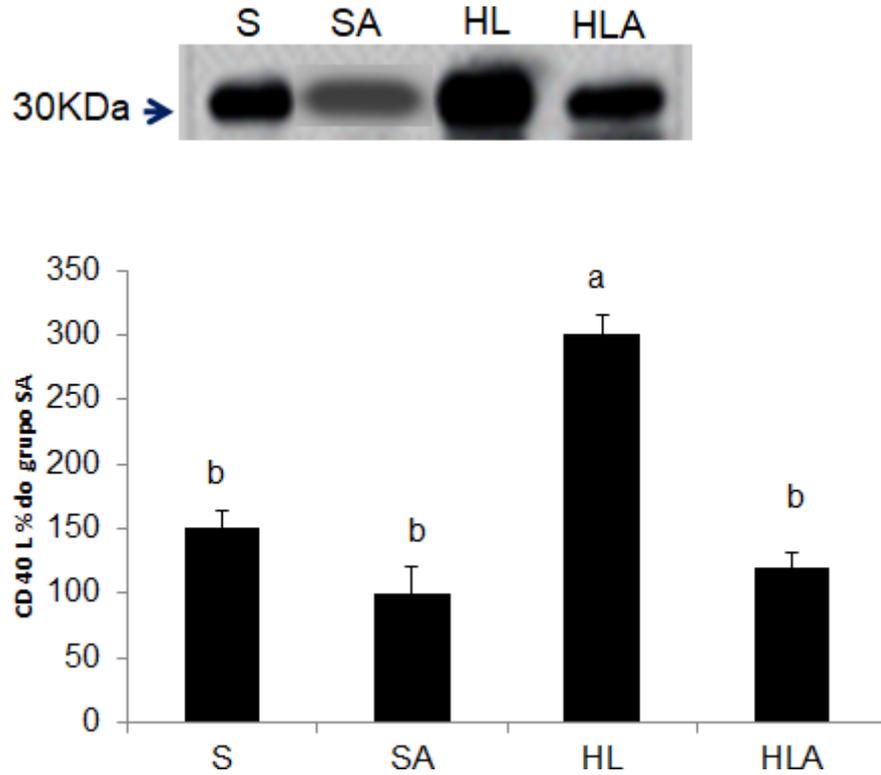


Figura 2 - Análise Western Blot da expressão da proteína CD40 ligante (CD40L) no ventrículo esquerdo de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta padrão (S, n = 10), camundongos LDLr^{-/-} alimentados com uma dieta padrão tratada com extrato da folha da amoreira (SA, n = 10), camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (HL, n = 10) e camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com extrato da folha da amoreira (HLA, n = 10). (ANOVA + teste deTukey com nível de confiança de 95%).

Os valores foram expressos como média ± Erro Padrão da Média. Letras diferentes entre as colunas indicam diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05).

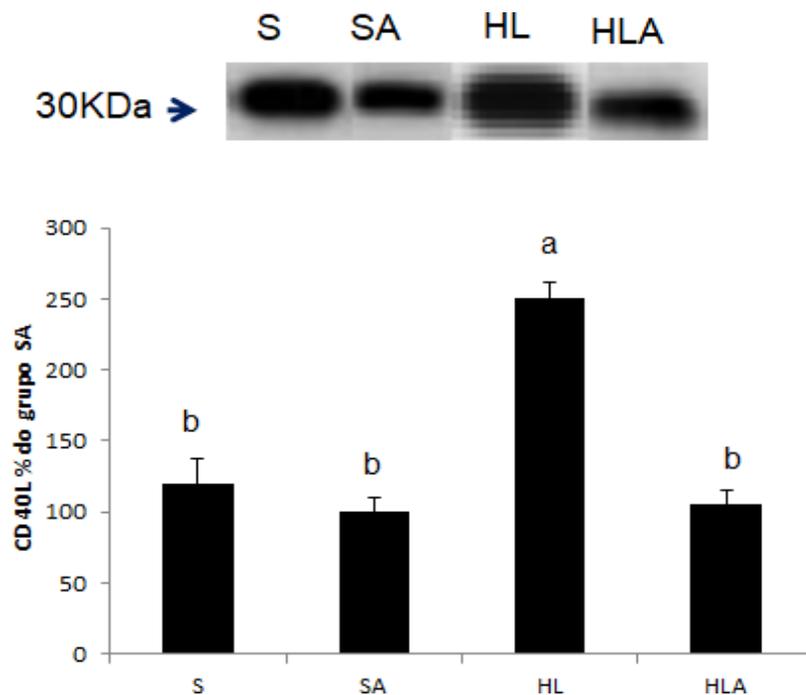


Figura 3- Análise Western Blot da expressão da proteína ligante CD40 (CD40L) na aorta de camundongos LDLr -/- alimentados com uma dieta padrão (S, n = 10), camundongos LDLr -/- alimentados com uma dieta padrão tratada com extrato da folha da amoreira (SA, n = 10), camundongos LDLr -/- alimentados com dieta hiperlipídica (HL, n = 10) e camundongos LDLr -/- alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com extrato da folha da amoreira (HLA, n = 10). (ANOVA + teste deTukey com nível de confiança de 95%). Os valores foram expressos como média ± Erro Padrão da Média. Letras diferentes entre as colunas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

O extrato da folha da amoreira preveniu parcialmente a HVE dos camundongos do grupo HLA prevenindo o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e a porcentagem do depósito de colágeno. Além disso, o extrato da folha da amoreira preveniu o aumento da expressão do CD40L no miocárdio e na aorta dos camundongos HLA, não apresentando diferenças quando comparados com os camundongos do grupo S e SA.

Discussão

Os camundongos que receberam dieta hiperlipídica no presente estudo, desenvolveram dislipidemia severa, com intensificação do processo inflamatório e ativou a via CD40L com aumento na sua expressão. Além disso, o modelo animal estudado demonstrou ativação no processo oxidante (CARDOSO., et al. 2011), com aumento do estresse oxidativo (SARTO et al., 2018) e diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (ABEL et al., 2014).

Esse aumento do estresse oxidativo elevou a peroxidação lipídica da molécula de HDL e conseqüentemente a sua remoção hepática (HOLVOET, 2008; SARTO et al., 2018), com diminuição dos níveis plasmáticos do HDL e da sua função cardiovascular protetora antioxidante e anti-inflamatória, favorecendo ainda mais o processo inflamatório cardiovascular. A oxidação dos receptores da insulina, neste modelo animal, gerou a resistência insulínica com hiperinsulinemia nos camundongos do grupo HL. Assim, no presente estudo, observou-se aumento de fatores hipertróficos cardíacos no grupo HL, como hiperinsulinemia (SARTO et al., 2018), aumento na expressão de CD40L (SANTOS et al., 2017), hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (GARCIA; INCERPI, 2008; SILVA et al., 2015) e a diminuição de fatores anti-hipertróficos cardíaco, como o óxido nítrico (GARCIA; INCERPI, 2008) e conseqüentemente os camundongos do grupo HL apresentaram HVE.

No presente estudo, o extrato das folhas da amoreira nos camundongos do grupo HLA preveniu o aumento dos níveis plasmáticos do colesterol total em 66% e do LDL em 53%, mostrando que o extrato apresentou uma atividade hipolipemiante muito semelhante aos estudos de Junior et al. (2017), em que o extrato minimizou a dislipidemia e o estresse oxidativo além de

promover a redução do índice aterogênico em ratos diabéticos. Esse efeito hipolipemiante da *Morus nigra* pode estar relacionado ao ácido clorogênico e quercitina encontrados no extrato de suas folhas. Esses compostos podem atuar como adjuvantes no processo de queda dos níveis de colesterol total e LDL (ZENI et al., 2017). Além disso, observou-se também que o extrato não só preveniu a diminuição dos níveis do HDL como também aumentou seus níveis plasmáticos em 34% no grupo SA em relação ao grupo S, e 300% no grupo HLA em relação ao HL, melhorando as relações CT/HDL e LDL/HDL nos camundongos do grupo HLA.

O extrato das folhas da amoreira apresentou efeito benéfico sobre a dislipidemia genética associada à dieta hiperlipídica em camundongos knockout para o gene do receptor de LDL, prevenindo parcialmente a hipercolesterolemia e aumentando os níveis plasmáticos de HDL. O aumento dos níveis plasmáticos de HDL nos camundongos tratados com o extrato da folha da amoreira e a presença de compostos fenólicos nesse extrato, como os ácidos cafeoilquínicos (SILVA, 2012), estão relacionados a menor ocorrência do processo inflamatório cardiovascular nos camundongos do grupo HLA.

Os compostos fenólicos da folha da amoreira, principalmente os ácidos cafeoilquínicos (SILVA, 2012), podem ter contribuído para prevenir a oxidação do HDL e sua remoção hepática (CHRISTISON et al., 1996), assim como também por ação direta como antioxidante (TURGUT, 2015; DALMAGRO; CAMARGO; ZENI, 2017; SCHAFRANSKI et al., 2019) no sistema cardiovascular. O papel anti-inflamatório da HDL pode estar relacionado a seu efeito antioxidante (HOLVOET et al., 2008; GARCIA et al., 2011). A molécula do HDL também inibe a expressão das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (VCAM-1, ICAM-1 e Selectina E) induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias (XIA et al., 1999), o que diminui a transmigração dos monócitos para a região subendotelial. Esses efeitos explicam a prevenção na inflamação cardiovascular, caracterizada pela baixa expressão do CD40L na aorta e no miocárdio, assim como a prevenção no aumento dos níveis plasmáticos da PCR, um marcador de processo inflamatório cardíaco (SARTO et al., 2018).

Outros estudos (ALMEIDA et al., 2011; ALBUQUERQUE; NERI, 2012) não encontraram efeito hipoglicemiante do extrato de *Morus nigra* L. Contudo, os estudos de Júnior et al. (2017), demonstraram que o tratamento a curto prazo com o extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L, reduziu a hiperglicemia, melhorou a tolerância oral à glicose e promoveu a redução do índice aterogênico em ratos diabéticos. No presente estudo, o extrato

das folhas de amoreira não apresentou efeito hipoglicemiante, porém, preveniu o aumento dos níveis plasmáticos da insulina e do HOMA_{ir} nos camundongos do grupo HLA. Isso pode ser atribuído aos componentes fitoquímicos (SILVA, 2012) encontrados no extrato das folhas, como os ácidos cafeoilquínicos. Os ácidos cafeoilquínicos são compostos fenólicos com atividade antioxidante semelhante a outros ácidos fenólicos, são eficientes no sequestro de radicais livres (PRAKASH et al., 2007). Algumas propriedades terapêuticas dos ácidos cafeoilquínicos estão relacionadas ao seu efeito anti-inflamatório, como inibidor da xantinaoxidase, modulador do estresse oxidativo induzido por peróxido, atenuador da oxidação do colesterol e efeito hipotensor em ratos (SILVA, 2012). A provável redução do estresse oxidativo tecidual pelo efeito do extrato das folhas da amoreira nos camundongos HLA melhorou a sinalização da insulina, prevenindo a resistência insulínica e reduzindo a hiperinsulinemia, para manter os níveis plasmáticos da glicose nos camundongos do grupo HLA dentro dos padrões observados nos grupos S e SA.

Além de prevenir totalmente a resistência insulínica, a hiperinsulinemia, além da redução dos níveis plasmáticos de HDL e da expressão do CD40L na aorta e miocárdio, e ainda prevenir parcialmente a hipercolesterolemia, o extrato das folhas da amoreira nos camundongos no grupo HLA, preveniu parcialmente a HVE, com menor área de colágeno no miocárdio, quando comparado a HVE dos camundongos do grupo HL. O extrato da folha de amoreira não preveniu a hipertrigliceridemia nos camundongos dos grupos SA e HLA. Simko et al. (2002) demonstraram que a hipertrigliceridemia em ratos resulta em crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo, associado ao remodelamento fibrótico mínimo. Esse pode ter sido o fator pelo qual o extrato da folha de amoreira não preveniu totalmente a HVE, que se apresentou com menor área de tecido fibroso miocárdico nos camundongos do grupo HLA.

Conclusão

O extrato das folhas da amoreira apresentou benefícios no reequilíbrio da homeostasia metabólica dos lipídeos e conseqüentemente do estado inflamatório ativado pela dislipidemia genética associada à ingestão da dieta hiperlipídica, com exceção da hipertrigliceridemia, prevenindo a inflamação cardiovascular e a resistência insulínica, reduzindo o desenvolvimento da HVE.

Referências

ABEL, L. C. et al. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by *Trypanosoma cruzi* Is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by IFN- gamma and CD40-CD40L interactions. **Mediators Inflamm.** v. 2014, 2014: 345659. doi:10.1155/2014/345659.

AGHABABAEI, S. K. et al. Effects of blackberry (*Morus nigra* L.) consumption on serum concentration of lipoproteins, apo A-I, apo B, and high-sensitivity-C-reactive protein and blood pressure in dyslipidemic patients. **J Res Med Sci.** v. 20, n. 7, p. 684-691, 2015.

ALBUQUERQUE, M. A. C. de; NERI, D. F. de M. Uso do extrato etanólico das folhas da *Morus nigra* L. (Moraceae) como proposta de tratamento do diabetes Mellitus associado ao alcoolismo crônico. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 7.; JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACEPE/UNIVASF, 1., 2012, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012.

ALMEIDA, J. R. G. da S. et al. Evaluation of Hypoglycemic Potential and Pre-Clinical Toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 30, n. 1, p. 96-100, 2011.

ALMEIDA J. R. G. S. et al. Medicinal Plants and Natural Compounds from the Genus *Morus* (Moraceae) with Hypoglycemic Activity: A Review. **Intech.** v. 11, p.189-206, 2012.

ARAÚJO, C. M. et al. *Morus nigra* leaf extract improves glycaemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. **Food Funct.** v. 6, n. 11, p. 3490–3499, 2015.

ARMSTRONG, A. T. et al. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. **J Am Coll Cardiol.** v. 32, p. 704–710, 1998.

BARBALHO, S. M.; BECHARA, M. D.; QUESADA. Et al. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: tríade indissociável?. **Jornal Vascular Brasileiro.** v. 14, n. 4, p. 319-327, 2015.

CARVALHO, K. M.; MARINHO FILHO, J.D.; DE MELO, T. S. et al. The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice: Scientific Evidence and Potential Mechanisms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: Ecam.** v. 2015, 2015:106157. doi: 10.1155/2015/106157.

CASARIN, F.; MENDES, C. E.; LOPES, T. J. Planejamento experimental do processo de secagem da amora -preta (*Rubus sp.*) para a produção de farinha enriquecida com compostos bioativos. **Brazilian Journal Of Food Technology**. v.19, p.01-08, 2016.

CASTILHO-HERNANDEZ, J. et al. A obesidade é um determinante da resistência à insulina mais importante do que os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 57, n. 4, p. 320-329, 2017.

CHEN, H. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L). **PLoS ONE**. v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016.

CHRISTISON, J. et al. Rapid reduction and removal of HDL- but not LDL-associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. **Biochem J**. v. 314, n. 3, p. 739-742, 1996.

CORICA, D. et al. Could AGE/RAGE-Related Oxidative Homeostasis Dysregulation Enhance Susceptibility to Pathogenesis of Cardio-Metabolic Complications in Childhood Obesity? **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 10, p.426, 2019.

COSTA, G. R. **Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora silvestre (*Morus nigra* L.), amora preta (*Rubus spp*), e grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam) no crescimento e na expressão de genes e miRNAs de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama**. 2017. 100 f. Tese (Doutorado em Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/T.9.2017.tde-26102017-113658. Acesso em: 10-08-2019.

DALMAGRO, A. P.; CAMARGO, A.; ZENI, A. L. B. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. **Metab. Brain Dis.** v. 32, n. 6, p. 1963-1973, 2017.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVI, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clin. Chem.** v.18, p. 499-502, 1972.

GARCIA, J. A. D.; INCERPI, E. K. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 90, n. 6, p. 443-450, 2008.

GARCIA, J. A. D.; LIMA, C. C.; MESSORA, L. B. et al. Efeito anti-inflamatório da lipoproteína de alta densidade no sistema cardiovascular de camundongos hiperlipidêmicos. **Rev Port Cardiol.** v. 30, n. 10, p. 763-769, 2011.

GAYOSO-DIZ, P. et al. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. **BMC Endocrine Disorders.** v.13, p. 47-56, 2013.

HEDRICK, C. C. Et al. In vivo interactions of apoA-II, apoA- I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. **Journal of Lipid Research.** v. 42, p. 563-570, 2001.

HOLVOET, P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. **Verh K Acad Geneesk Belg.** v. 70, n. 3, p. 193-219, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz.** 2008. 1020 p.

JÚNIOR, I. I. D. S. et al. Brazilian *Morus nigra* Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Sci. World J.** v. 2017, 2017.

JUNQUEIRA, L. C; BIGNOLAS, G; BRENTANI, R. R. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J.** v. 11, p. 447-455, 1979.

LIMA, J. C. C.; MOREIRA A.; LIMA, D.; CORREIA, L. C. L. Validação da medida de proteína c reativa de alta sensibilidade por quimioluminescência para estimativa de risco cardiovascular em indivíduos ambulatoriais - análise comparativa com nefelometria. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica laboratorial.** v. 41 n. 1 p. 9-15, 2005.

OISHI, J. C, et al. Disfunção Endotelial e Inflamação Precedem a Elevação da Pressão Arterial Induzida por Dieta Hiperlipídica. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 110, n. 6, p. 558-567, 2018.

OLIVEIRA, F. P. A. et al. Vitamina D associada à resistência insulínica. **HU Revista,** v. 42, n. 2, 2016.

PRAKASH, D. et al. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **Int J Food Sci.** v. 58, v 1, p. 18-28, 2007.

SANTOS, L. et al. Soy milk versus simvastatin for preventing atherosclerosis and left ventricle remodeling in LDL receptor knockout mice. **Braz J Med Biol Res [online]**. v.50, n.3, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2017000300701&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 de Setembro de 2019.

SARTO, D. A. Q. S. et al. Dry Extract of *Passiflora incarnata* L. leaves as a Cardiac and Hepatic Oxidative Stress Protector in LDLr^{-/-} Mice Fed High-Fat Diet. **Braz. arch. biol. technol.** [online]. v. 61, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132018000100321&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10/01/2020.

SCHAFRANSKI, K. et al. Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.). **Quím. Nova [online]**. v. 42, n.7, p. 736-744, 2019.

SILVA, P. C. TORRES, F. Hipercolesterolemia e o desenvolvimento da aterosclerose: revisão de literatura. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**. v. 6, n. 1, p. 48-58, 2015.

SILVA, R. A. H. **Estudo da ação do extrato bruto de *Morus nigra* L. (Moreaceae) e frações fenólicas sobre a atividade antimicrobiana e geração de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio: in vitro com ensaios químicos, enzimáticos e celular.** 2012. 178 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.

SILVERMAN, M. G. et al. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**. v. 316, n. 12, p. 1289-1297, 2016.

SIMKO, F. et. Heart remodeling in the hereditary hypertriglyceridemic rat: Effect of captopril and nitric oxide deficiency. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 967, p. 454-462, 2002.

SOUZA, G. R. et al. Atividade anticonceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. **Rev. ciênc. farm. básica apl.** v. 36, n. 1, p. 137-142, 2015.

STORCH, A. S. et al. Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas

Aplicações. **Int. J. Cardiovasc. Sci.** v. 30, n. 3, p. 262-273, 2017.

TIAN, J. et al. Hyperlipidemia is a major determinant of neointimal formation in LDL receptor-deficient mice. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 345, n. 3, p. 1004-1009, 2006.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem.** v. 6, n. 1, p. 24-27, 1969.

TURGUT, N. H.; MERT, D. G.; KARA, H.; EGILMEZ, H. R.; ARSLANBAS, E.; TEPE, B.; GUNCOR, H.; YILMAZ, N.; TUNCEL, N. B. Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d galactose induced aging mice. **Pharmaceutical Biology.** v. 54, n. 6, p. 1052-1064, 2015.

XIA, P. et al. High-density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. **J Biol Chem.** v. 274, n. 46, p. 33143-33147, 1999.

ZHANG, Y. et al. Anti-Diabetic, Anti-Oxidant and Anti- Hyperlipidemic Activities of Flavonoids from Corn Silk on STZ-Induced Diabetic Mice. **Molecules,** v. 21, n. 7, p. 1-11, 2015.

ZENI, A. L. B. et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v. 89, n. 4, p. 2805-2815, 2017.