

AMANDA DE ASSIS CARNEIRO

Atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato hidroetanólico das folhas de  
*Morus nigra L.*

BRASÍLIA, 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AMANDA DE ASSIS CARNEIRO

Atividade anti-inflamatória in vitro do extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra*  
*L.*

Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do Título de Doutora em Ciências  
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde da Universidade de  
Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Yris Maria Fonseca-  
Bazzo

BRASÍLIA, 2022

AMANDA DE ASSIS CARNEIRO

Atividade anti-inflamatória in vitro do extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra*  
*L.*

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 12 de dezembro, de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Angélica Amato

Leandra de Almeida R. Oliveira

Fernanda Maria Pinto Vilela

Paula Monteiro de Souza

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me abençoar e me mostrar o caminho todos os dias.

Ao meu marido que me apoiou incondicionalmente e me deu todo o suporte emocional para concluir este trabalho.

Aos meus pais e irmãos por me apoiarem e torcerem sempre por mim.

À professora Yris Maria Fonseca-Bazzo pela confiança em mim durante nove anos de orientação, paciência e muito aprendizado.

Às professoras Dâmaris Silveira e Pérola de Oliveira Magalhães, que junto com a professora Yris coordenam o Laboratório de Produtos Naturais (LaProNat) e estão sempre em busca de melhorias para o nosso ambiente de trabalho. Também agradeço às professoras e ao professor Maurício Mello por sempre estarem disponíveis para tirar dúvidas e contribuir com este trabalho.

Às técnicas do LaProNat, Júlia e Patrícia pela dedicação ao nosso laboratório, ajudando na organização e manutenção de equipamentos.

Ao professor Marcílio e ao Laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos e cosméticos (LTMAC) pela ajuda na parte da análise granulométrica.

À professora Heloísa e ao técnico André do Laboratório de toxicologia pela liofilização do extrato.

Ao professor Christopher pela identificação do material botânico.

Ao professor Simeoni, à Simone e ao Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) pela orientação e fornecimento dos reagentes e equipamentos para a realização do ensaio gene repórter.

À colega Gislaine por cuidar das minhas células sempre que precisei me ausentar, pela constante troca de ideias e pela amizade.

A todos os colegas da graduação, mestrandos e doutorandos do LaProNat que me auxiliaram de alguma forma e pela companhia agradável no Laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## RESUMO

A inibição da inflamação sistêmica tem se mostrado uma estratégia benéfica no tratamento de diversas doenças crônicas, que representam uma das maiores causas de mortalidade no mundo. Dessa forma, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) são alvos farmacológicos interessantes, uma vez que podem agir tanto pela via metabólica quanto pela via anti-inflamatória. As folhas da espécie *Morus nigra* L. possuem flavonoides em sua composição com reconhecida atividade antioxidante e, frequentemente, associados com a atividade anti-inflamatória. Assim, este estudo propõe avaliar a capacidade do extrato hidroetanólico das folhas de *M. nigra* em ativar os receptores PPAR e promover efeitos anti-inflamatórios em células de macrófago estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. O extrato foi preparado por maceração passiva a frio na proporção de 1:5 m/v, utilizando 95% de etanol como solvente, e a composição química foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A citotoxicidade do extrato foi testada pelo método do MTT em células RAW 264.7 e HeLa. A ativação dos receptores PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$ , e o receptor TR $\beta$  foi testada por meio do ensaio gene-repórter da luciferase em células HeLa. A capacidade anti-inflamatória do extrato foi avaliada após o tratamento de células RAW 264.7 estimuladas com LPS. A análise por CLAE revelou a presença de rutina (3,74  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) e isoquercitrina (5,92  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). O extrato apresentou citotoxicidade apenas nas concentrações maiores que 500  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . O extrato apresentou atividade agonista para os dois tipos de PPAR ( $\alpha$  e  $\gamma$ ), porém seus compostos majoritários (rutina e isoquercitrina) não ativaram o receptor de maneira significativa. O extrato foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico em 28 a 63%, de espécies reativas de oxigênio em 25 a 53% e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  em 25 a 68%. O tratamento com o antagonista específico de PPAR- $\alpha$ , GW 6471, foi capaz de bloquear parcialmente o efeito anti-inflamatório causado pelo extrato. Assim, possivelmente o efeito anti-inflamatório do extrato pode ser atribuído, pelo menos em parte, à ativação do receptor PPAR- $\alpha$ , sendo o primeiro estudo a avaliar a ativação deste receptor pelo extrato das folhas de *M. nigra* L.

**Palavras-chave:** *Morus nigra*; plantas medicinais; inflamação; PPAR.

## ABSTRACT

Inhibition of systemic inflammation has been a beneficial strategy in treating several non-communicable diseases, which represent one of the major causes of mortality in the world. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) are interesting pharmacological targets, since they can act both through the metabolic and anti-inflammatory pathways. *Morus nigra* L. has flavonoids in its chemical composition with recognized antioxidant activity and often associated with anti-inflammatory activity. Therefore, this study aimed to evaluate the hydroethanolic extract of *M. nigra* leaves' ability to activate PPARs and promote anti-inflammatory effects in *lipopolysaccharide* (LPS)-stimulated murine macrophage cells. The leaf extract was prepared by cold maceration in the ratio of 1:5 m/v, using 95% ethanol as solvent, and the chemical profile was obtained by HPLC-DAD. The cytotoxicity of the extract was tested by the MTT method on RAW 264.7 and HeLa cells. Activation of the PPAR  $\alpha$  and  $\gamma$ , and the Tr $\beta$  was tested using the luciferase gene-reporter assay in HeLa cells. The anti-inflammatory capacity of the extract was evaluated after the treatment of LPS-stimulated RAW 264.7 cells. HPLC analysis revealed the presence of rutin (3.74  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) and isoquercitrin (5.92  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). The extract showed cytotoxicity only at concentrations greater than 500  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . The extract showed agonist activity for both types of PPAR ( $\alpha$  and  $\gamma$ ), but its major compounds (rutin and isoquercitrin) did not significantly activate the receptor. The extract was able to reduce the production of nitric oxide from 28 to 63%, reactive oxygen species from 25 to 53% and the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  from 25 to 68%. Treatment with the specific PPAR- $\alpha$  antagonist, GW 6471, was able to partially block the anti-inflammatory effect caused by the extract. Thus, possibly the anti-inflammatory effect of the extract can be attributed, at least in part, to the activation of the PPAR- $\alpha$  receptor, being the first study to evaluate the activation of this receptor by the extract of the leaves of *M. nigra* L.

**Keywords:** *Morus nigra*; Medicinal plants; inflammation; PPAR

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore de <i>Morus nigra</i> em período de frutificação. Fonte: da autora .....	28
Figura 2 - Cromatograma e espectros do extrato hidroetanólico de <i>Morus nigra</i> , obtido por CLAE-DAD. ....	45
Figura 3 - Estruturas químicas dos flavonoides identificados no extrato de <i>M. nigra</i> . ....	46
Figura 4 - Citotoxicidade do extrato de <i>M. nigra</i> em células RAW 264.7 na ausência de LPS. ....	49
Figura 5 - Citotoxicidade do extrato de <i>M. nigra</i> em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. ....	49
Figura 6 - Citotoxicidade do extrato de <i>M. nigra</i> em células HeLa.....	50
Figura 7 – Ativação do PPAR- $\gamma$ avaliado pelo ensaio do gene repórter.....	51
Figura 8 – Ativação do PPAR- $\alpha$ avaliado pelo ensaio gene repórter da luciferase...	53
Figura 9 - Ativação do receptor TR $\beta$ pelo extrato de <i>M. nigra</i> . ....	56
Figura 10 - Inibição da produção de Espécies Reativas de Oxigênio. Inibição da produção de EROs em células RAW 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com o extrato de <i>M. nigra</i> .....	58
Figura 11 - Redução da produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas com Lipolisacarídeo de <i>Escherichia coli</i> .....	60
Figura 12 – Redução da produção do Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) em células RAW 264.7. ....	61
Figura 13 – Resumo gráfico.....	64



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição da análise por CLAE-DAD.....	35
Tabela 2 - Resultados da análise por CLAE-DAD do extrato de <i>Morus nigra</i> . .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE – Anti-inflamatórios esteroides

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP-1 – Proteína ativadora 1

BCA – Ácido bicinconínico

BSA – Albumina de soro bovino

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COX – Ciclo-oxigenases

CV – Coeficiente de variação

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

EHMN – Extrato hidroetanólico de *M. nigra*

EPR – Erro Padrão Relativo

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GR – Receptor de glicocorticoide

IC – Inclinação da reta

IL - Interleucina

LCQ – Laboratório de controle da qualidade de medicamentos

LPS – Lipopolissacarídeo

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase

NF-KB – Fator nuclear *Kappa* B

NOS – Óxido nítrico sintase

ON – Óxido nítrico

PPAR - Receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PPRE – Elemento responsivo de proliferador de peroxissoma

SFB – Soro Fetal Bovino

T<sub>3</sub> - Triiodotironina

TLR – Receptor do tipo *Toll*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TR – Receptor do hormônio tireoidiano

UnB – Universidade de Brasília

UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 INFLAMAÇÃO .....	13
2.1.1 - Inflamação aguda.....	13
2.1.2 Inflamação crônica.....	15
2.1.3 Mediadores inflamatórios .....	16
2.1.4 Fatores de transcrição relacionados à inflamação .....	19
2.1.5 Tratamento convencional da inflamação.....	21
2.2 RECEPTORES NUCLEARES .....	22
2.2.1 Receptores ativados por proliferador de peroxissoma $\gamma$ .....	24
2.2.2 Receptores ativados por proliferador de peroxissoma $\alpha$ .....	25
2.3 PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA MEDICAMENTOSA .....	26
2.3.1 <i>Morus nigra</i> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	33
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO .....	33
4.3 TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS .....	34
4.4 RENDIMENTO .....	34
4.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES FITOQUÍMICOS.....	35
4.6 CULTIVO CELULAR .....	36
4.6.1 Citotoxicidade do extrato.....	37
4.6.2 Ensaio do gene repórter da Luciferase.....	38
4.6.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio .....	41
4.6.4 Dosagem de óxido nítrico .....	41

<b>4.6.5 Determinação de TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>42</b>
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
5.1 TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS .....	44
5.2 RENDIMENTO .....	44
5.3 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES FITOQUÍMICOS.....	44
5.4 CITOTOXICIDADE DO EXTRATO .....	47
5.5 ATIVAÇÃO DE RECEPTORES NUCLEARES - ENSAIO GENE REPÓRTER ...	50
<b>5.5.1 Avaliação da ativação dos receptores PPAR</b> .....	<b>50</b>
<b>5.5.2 Avaliação da ativação do receptor TR<math>\beta</math></b> .....	<b>55</b>
5.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO .....	56
<b>5.6.1 Redução da produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio</b> .....	<b>57</b>
<b>5.6.2 Redução da produção de óxido nítrico</b> .....	<b>59</b>
<b>5.6.3 Redução da citocina pró-inflamatória TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A exposição a estímulos nocivos, como patógenos, toxinas e lesão celular leva ao desencadeamento de uma série de eventos complexos que estão compreendidos na resposta inflamatória. Esta resposta é essencial como medida protetora e reparadora natural, porém, o prolongamento da inflamação e falha na resolução podem causar danos e contribuir com a manutenção de doenças crônicas (1–3).

Os anti-inflamatórios esteroides (AIEs) e os não esteroides (AINEs) são os dois grupos de tratamento, para doenças inflamatórias, disponíveis no mercado, sendo o último uma das classes de medicamento mais prescrita e vendida no mundo. Porém, a segurança destes medicamentos é frequentemente questionada devido aos efeitos adversos associados a eles, principalmente no uso prolongado (4). Como exemplo, os AIEs podem causar complicações na diabetes (5), agravamento de úlceras, hipertensão (6), osteoporose (7) e supressão da produção endógena de esteroides (4). Enquanto os AINEs estão mais associados com o aumento do risco de problemas cardiovasculares (4,8,9), renais (10) e gastrointestinais (11,12). Assim, torna-se necessário a busca por outras substâncias que possam oferecer um tratamento eficiente, mais tolerável e homeostático.

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) são receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição regulando a expressão de diversos genes. Estes receptores agem principalmente no metabolismo de lipídios e glicose. Além disso, nos últimos anos, os PPARs, principalmente os subtipos  $\alpha$  e  $\gamma$ , têm sido associados com a atividade anti-inflamatória devido à capacidade de inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e promover a diferenciação de células imunes. Dessa forma, estes receptores constituem alvos farmacológicos relevantes para novas drogas anti-inflamatórias, principalmente no caso de doenças crônicas de caráter metabólico relacionadas com um estado inflamatório crônico geral (13,14).

As folhas da espécie *Morus nigra* L., conhecida popularmente como amoreira, são utilizadas tradicionalmente na forma de chá, principalmente, para o alívio de sintomas do climatério (15), diminuição do colesterol, perda de peso (16,17) e controle

de diabetes (18,19). Em sua composição, já foi relatado a presença de rutina, quercetina, kaempferol, quercitrina e ácido clorogênico (20–22). Essas substâncias possuem reconhecida atividade antioxidante e frequentemente são relacionadas à atividade anti-inflamatória (23,24). Assim, este estudo propõe-se a avaliar a capacidade do extrato hidroetanólico das folhas de *M. nigra* de ativar os receptores PPAR e promover efeitos anti-inflamatórios em células de macrófagos murinos estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma reação imunológica desencadeada pela exposição a fatores nocivos, na qual ocorre uma série de eventos complexos que em condições normais, permanece na fase aguda e funciona como uma medida protetora do corpo permitindo a rápida reparação do dano e eliminação do patógeno. Porém, o prolongamento da resposta inflamatória pode ocasionar uma série de danos teciduais e inclusive desencadear outras doenças (1).

#### 2.1.1 - Inflamação aguda

A inflamação aguda inicia-se rapidamente após um estímulo nocivo que podem ser bactérias, vírus, parasitas, fungos, toxinas, lesões teciduais ocasionadas por traumas ou agentes químicos e físicos, ou reações de hipersensibilidade. Sua principal característica consiste no acúmulo de proteínas plasmáticas e neutrófilos no local. Geralmente é controlada e autolimitada, com resolução em período curto (25).

A detecção dos estímulos nocivos ocorre por meio de diferentes tipos de receptores que reconhecem padrões comuns aos microorganismos e células mortas. Estes padrões são denominados como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados aos danos (DAMPs). Ao detectar estes padrões, os receptores desencadeiam cascatas que irão culminar no desenvolvimento do processo inflamatório (25,26).

Os receptores do tipo *Toll* (TLR) são encontrados na membrana plasmática de células endoteliais, macrófagos, neutrófilos e outros tipos celulares. Eles realizam o reconhecimento de PAMPs resultando em uma cascata de ativação do fator de transcrição NFκB, que é responsável pela indução da expressão de citocinas inflamatórias (25,26).



O P2X7, pertencente à família dos receptores purinérgicos, é um exemplo de receptor que realiza o reconhecimento de DAMPs. Ele consiste em um canal iônico e é expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e outros. O ATP, presente em excesso no meio extracelular em condições de estresse, injúrias ou liberado por células mortas, ativa o receptor P2X7 implicando em mudanças na homeostase iônica das células. Como consequência, ocorre a liberação de radicais livres, mediadores inflamatórios e ativação do inflamossoma (27,28).

O inflamossoma consiste em um complexo citoplasmático capaz de reconhecer DAMPs e PAMPs. Sua ativação promove a ação da enzima caspase 1 que cliva as formas precursoras da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ocasionando a liberação da forma biologicamente ativa (25,29).

Após o reconhecimento dos estímulos pelos receptores, os macrófagos residentes ativados iniciam o processo de fagocitose e ocorrem as primeiras alterações vasculares. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade dos capilares permitem o aumento do fluxo sanguíneo e a formação do exsudato, que é o acúmulo de líquido rico em proteínas e leucócitos no local da infecção. Essas alterações trazem como consequência os sinais clássicos da inflamação: calor, eritema, edema, dor e perda de função (25).

Os neutrófilos são os principais leucócitos recrutados na fase aguda da inflamação. Primeiro, por um processo denominado marginação, se acumulam na parede dos vasos sanguíneos e então ocorre o rolamento na superfície endotelial com o auxílio das moléculas de adesão da família das selectinas. Por fim, após o processo de adesão mediado pelas integrinas, os leucócitos migram pela parede do vaso, orientados pelo estímulo das quimiocinas, até o local da infecção ou lesão (25,30).

Após serem ativados por mediadores, microorganismos e/ou células necróticas, os neutrófilos iniciam a fagocitose e a destruição intracelular de microorganismos ou outras partículas por meio da liberação de substâncias que incluem espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio. Além disso, também ocorre a liberação destas mesmas substâncias para a destruição extracelular e a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas (31).

Na maioria das vezes, o processo inflamatório é autolimitado e segue para a regeneração do tecido. Os estímulos nocivos são removidos, os macrófagos auxiliam na remoção de células inflamatórias e restos necróticos, mediadores pró-inflamatórios são neutralizados e ocorre a liberação de mediadores que inibem a inflamação e promovem o início do processo de reparo tecidual. Novos vasos sanguíneos são formados e há o estímulo da proliferação de fibroblastos e células teciduais residentes (32,33).

### 2.1.2 Inflamação crônica

Quando há dificuldade na remoção do estímulo nocivo ou interferências no processo normal de resolução, a inflamação pode progredir para a fase crônica e persistir por um longo período. Nesta fase, a lesão tecidual e a formação de fibrose são mais acentuadas e as células mononucleares, como os macrófagos e linfócitos, são predominantes (25).

Os macrófagos e os linfócitos interagem de modo a criar um mecanismo de *feedback* importante para a manutenção da inflamação crônica, que permite o recrutamento contínuo dos macrófagos no local da lesão. Além da função clássica de eliminação de patógenos e tecidos mortos, os macrófagos possuem papel essencial na reparação do tecido. Eles desencadeiam a angiogênese por meio da secreção de fatores de crescimento, estimulam a produção de colágeno e ativam fibroblastos (34). Enquanto os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos para a liberação de anticorpos e os linfócitos T liberam citocinas para a modulação da resposta inflamatória (25).

A consequência da inflamação crônica vai depender da extensão da lesão e da capacidade regenerativa do tecido afetado. Pode ocorrer a restauração completa da estrutura e função do tecido ou a cicatrização. O processo de cicatrização acontece após lesão tecidual considerável ou quando a inflamação ocorre em tecidos de baixa capacidade regenerativa, e é caracterizado pelo depósito extenso de tecido conjuntivo, formando a fibrose e podendo comprometer a função do órgão (25,34).

Além da inflamação crônica localizada que se desenvolve após uma fase aguda não resolvida, desencadeada por estímulos nocivos clássicos, também há a

inflamação crônica sistêmica (ICS) que, na maioria das vezes, está mais relacionada às alterações nas condições homeostáticas.

Entre as causas da ICS, estão os processos endógenos relacionados ao envelhecimento, que podem contribuir para a manutenção e progressão de doenças crônicas. Como há um aumento fisiológico de células danificadas ou mortas e uma diminuição da eliminação destas pelo proteassomo, essas moléculas são reconhecidas pelos receptores do sistema imune, desencadeando processos inflamatórios (35).

Outros fatores que favorecem o surgimento da ICS estão mais associados ao estilo de vida e meio-ambiente, como a dieta (36), obesidade (37), sedentarismo, estresse crônico, tabagismo, exposição aos poluentes do ar e infecções crônicas (35,38).

Este estado inflamatório geral é caracterizado pelo aumento do estresse oxidativo, de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas de fase aguda e é associado à diversas doenças crônicas não transmissíveis, como a aterosclerose, diabetes tipo II, doenças neurodegenerativas e câncer (39–41), que possuem grande relevância na saúde pública, uma vez que representam uma das maiores causas de mortalidade no mundo (35,42).

A literatura demonstrou que a inibição dessa resposta inflamatória parece proteger animais experimentais portadores destas doenças (43). Além disso, ensaios clínicos que utilizaram medicamentos inibidores de citocinas pró-inflamatórias obtiveram resultados benéficos no tratamento de diferentes doenças crônicas não transmissíveis (44,45).

### **2.1.3 Mediadores inflamatórios**

Os mediadores inflamatórios são os responsáveis por regular os eventos vasculares e celulares da inflamação e incluem as citocinas, aminas vasoativas, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido

nítrico (ON), sistema complemento e outros. A maioria deles são produzidos e secretados por células ativadas no local (25). Aqui serão retratados os mediadores de interesse deste trabalho.

### 2.1.3.1 Citocinas

As citocinas são polipeptídios secretados por leucócitos e outras células. Dentro do grupo das citocinas estão as interleucinas, o fator de necrose tumoral, interferons e o fator de crescimento transformante. Eles são divididos em grupos de acordo com o seu receptor alvo (46).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma das principais citocinas mediadoras da resposta inflamatória aguda e crônica. Ele é produzido principalmente por macrófagos ativados, linfócitos e células endoteliais. No local da inflamação, ele estimula a produção de quimiocinas e outros mediadores e ativa células endoteliais para expressar moléculas de adesão. Assim, ocorre o recrutamento de mais leucócitos para o local da inflamação. Além de atuar localmente, o TNF- $\alpha$  pode entrar na circulação sanguínea e causar efeitos sistêmicos como o estímulo da produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, estímulo da liberação do hormônio adrenocorticotrófico, queda da pressão sanguínea, febre, mialgias e outros (46,47).

As interleucinas (IL) são citocinas que participam principalmente da comunicação entre leucócitos. A IL-6 auxilia no recrutamento de células imunes para o local da inflamação por meio da indução da liberação de quimiocinas por células endoteliais e do músculo liso. Além disso, também induz a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, estimula a produção de leucócitos pela medula óssea e induz a produção de prostaglandinas no cérebro resultando no aumento da temperatura corporal (48,49).

A IL-1 $\beta$  é produzida sobretudo por monócitos e macrófagos, necessitando da ativação do inflamossoma para a liberação de sua forma ativa. Assim como o TNF, a IL-1 $\beta$  também induz a expressão de moléculas de adesão e estimula a produção de quimiocinas. Também induz a secreção das proteínas de fase aguda e ajuda na indução da febre por aumentar a secreção de prostaglandinas (25,50).

### 2.1.3.2 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PG) são mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico (AA). O AA consiste em um ácido graxo de 20 carbonos que compõe, na forma esterificada, os fosfolípidios da membrana celular. Após a ativação de fosfolipases, o AA é liberado da membrana celular e pode ser transformado em prostaglandinas pela ação das enzimas ciclo-oxigenases (COX)(25).

A enzima COX-1 é produzida de forma constitutiva na maioria das células e tecidos normais, sendo responsável também por funções homeostáticas. Enquanto a COX-2 tem distribuição mais restrita e é produzida principalmente em resposta aos estímulos inflamatórios. Entretanto, as duas são relevantes no processo inflamatório e na homeostase (51,52).

A prostaglandina  $E_2$  é uma das mais relevantes na inflamação, estando envolvida nos sinais clássicos eritema, edema, calor e dor. A liberação da  $PGE_2$ , estimulada por citocinas pró-inflamatórias, nas áreas adjacentes ao hipotálamo eleva o AMP cíclico e ocasiona um aumento da geração e diminuição da perda de calor, resultando na elevação da temperatura corporal. Na dor, a  $PGE_2$  atua diminuindo o limiar de excitabilidade dos nociceptores (receptores de dor). Além disso, as prostaglandinas também são responsáveis pela vasodilatação, contribuindo para a formação de eritema e edema (25,51).

### 2.1.3.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são radicais livres que podem ser gerados em diversos processos metabólicos na mitocôndria, citoplasma e membrana celular. Nos fagossomas de neutrófilos e macrófagos ativados por estímulos inflamatórios, as ERO são sintetizadas pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. Intracelularmente, elas possibilitam a destruição de patógenos e restos celulares fagocitados e quando são secretadas induzem o aumento da expressão de outros mediadores inflamatórios (25,53).

Embora sejam necessárias para a eliminação efetiva de patógenos, quando há um processo de estresse oxidativo no qual as ERO estão em excesso, seja por aumento da taxa de produção ou por remoção ineficiente, elas causam lesão tecidual por diferentes mecanismos: peroxidação lipídica de membranas, ativação de proteases, inativação de antiproteases e lesões ao DNA implicando em envelhecimento ou morte celular (53,54).

Além do processo inflamatório poder gerar estresse oxidativo, o estresse oxidativo também pode ocasionar um processo inflamatório crônico por meio da ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios. Portanto, os mecanismos protetores antioxidantes são essenciais para minimizar processos nocivos durante estes dois eventos.

#### 2.1.3.4 Óxido nítrico (ON)

O óxido nítrico (ON) também é um radical livre, na forma de gás, solúvel e de vida curta. Ele é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que é dividida em três isoformas conforme sua distribuição nos tecidos. O tipo II, denominada NOS induzível (iNOS), é encontrado em macrófagos e células endoteliais e tem papel fundamental na inflamação. A iNOS é induzida por outros mediadores inflamatórios, principalmente pelo TNF, IL-1 e endotoxinas bacterianas (55,56).

No processo inflamatório, o ON tem função citotóxica, ajudando a eliminar agentes microbianos. Além disso, também induz o relaxamento do músculo liso vascular, antagoniza a ativação plaquetária e reduz o recrutamento de leucócitos (25,57).

#### **2.1.4 Fatores de transcrição relacionados à inflamação**

Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA, em uma região específica, podendo ativar ou reprimir a transcrição de um gene. Assim, ocorre o aumento ou a redução da síntese da proteína codificada. No caso da resposta

inflamatória, a ativação ou repressão de fatores de transcrição específicos é responsável pela liberação de mediadores que podem reduzir ou aumentar a inflamação (58). Existem muitos fatores de transcrição que se relacionam com o processo inflamatório, aqui serão abordados apenas aqueles pertinentes para o propósito deste estudo.

#### 2.1.4.1 Fator Nuclear *Kappa* B

O Fator nuclear Kappa B (NF-KB) tem sua ativação induzida por vários patógenos, radicais livres, endotoxinas e citocinas. O lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são um dos seus indutores mais potentes. Quando ativado, o NF-KB induz o aumento da produção de mediadores inflamatórios, como a IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF-  $\alpha$ , moléculas de adesão que auxiliam no recrutamento de leucócitos e as enzimas iNOS e ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (59–61).

Como os mediadores TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de terem sua produção induzida pelo NF-KB, também são indutores deste fator de transcrição, ocorre um ciclo autorregulatório que amplifica a resposta inflamatória e contribui com sua cronificação. Inclusive, a literatura evidencia a relação entre a ativação deste fator e a patogênese de doenças inflamatórias crônicas como a asma, artrite reumatoide, aterosclerose e Alzheimer (62,63).

#### 2.1.4.2 Proteína Ativadora 1

A proteína ativadora 1 (AP-1) consiste em um grupo de fatores de transcrição que engloba quatro subfamílias: Jun, Fos, Maf e ATF. Este grupo atua em diferentes aspectos do sistema imunológico, como a ativação de células T e no processo inflamatório (64). A ativação da AP-1 também ocorre com uma grande variedade de estímulos que incluem fatores de crescimento, hormônios, bactérias, vírus, citocinas e espécies reativas de oxigênio (65).

Na inflamação, a AP-1 atua, principalmente, em conjunto com o NF-KB. Esta co-ativação foi observada em diferentes condições inflamatórias e pode ocorrer por contato direto entre os fatores de transcrição ou pelo compartilhamento da região promotora de genes pró-inflamatórios. Como resultado, há um aumento da produção de citocinas como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (66).

Assim como o NF-KB, a AP-1 também está sujeita aos efeitos autorregulatórios que amplificam a resposta inflamatória, podendo contribuir com o desenvolvimento de câncer e a cronificação de outras patologias (67).

### **2.1.5 Tratamento convencional da inflamação**

As doenças inflamatórias são tratadas convencionalmente com os anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticoides) ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), sendo esta última classe, uma das mais prescritas e vendidas no mundo. Entretanto, estas duas classes de medicamentos causam muitos eventos adversos, sendo essencial a busca por outras opções de tratamento (4).

#### **2.1.5.1 Glicocorticoides**

Os glicocorticoides são hormônios esteroides que exercem sua ação pela ativação do receptor específico para esta classe, o receptor de glicocorticoides (GR), regulando a expressão de diversos genes. Um dos principais mecanismos de ação dos glicocorticoides é a interferência na atividade de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como o fator nuclear *Kappa* B (NF-kB) e a proteína ativadora 1 (AP-1). Seus efeitos englobam a supressão da produção de mediadores inflamatórios, a diminuição do extravasamento de leucócitos e redução da fibrose (52,68,69).

Entretanto, as altas doses e o uso prolongado de glicocorticoides podem causar diversos efeitos adversos. Alguns glicocorticoides possuem alta ação mineralocorticoide, que ocasiona a retenção de líquidos, hipertensão e perda de potássio. Além disso, podem causar imunossupressão, aumentando o risco de infecções e sua gravidade, transtornos do humor, osteoporose, glaucoma, úlcera



péptica, inibição do crescimento de crianças, supressão da suprarrenal e outros (7,52,70,71).

#### 2.1.5.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINE)

Os AINEs são ácidos orgânicos que possuem ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória. Seus efeitos ocorrem principalmente pela inibição das enzimas ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), que é responsável pela síntese de prostaglandinas. Com a diminuição dos níveis de prostaglandinas, ocorre a redução da formação de edema, da sensibilização de receptores de dor e da indução de febre (25,52).

Essa classe de medicamentos pode ser dividida em duas subclasses, os AINEs não seletivos e os inibidores seletivos da COX-2. Os não seletivos estão mais associados com os efeitos adversos gastrointestinais, que incluem dor abdominal, náuseas, formação de úlceras e diarreia (11,12,52). Enquanto os inibidores seletivos da COX-2 são mais associados aos eventos tromboembólicos, como o acidente vascular cerebral e o infarto do miocárdio (8,9,52,72). Além disso, os AINEs também são responsáveis por reações de hipersensibilidade (73), retenção de sódio e água, hiperpotassemia e outros problemas renais (10,52,74).

## 2.2 RECEPTORES NUCLEARES

A sinalização celular é o processo de comunicação entre as células essencial para a manutenção do funcionamento de organismos multicelulares. Assim, as células são capazes de reconhecer sinais externos e produzir respostas específicas como a modificação do metabolismo, a diferenciação, divisão e crescimento celular. O reconhecimento dos sinais é realizado por meio de receptores específicos, que se ligam às moléculas sinalizadoras (ligantes) desencadeando diversos processos químicos na célula-alvo (58).

A maioria dos receptores encontram-se na superfície celular ancorados na membrana plasmática. Neste caso, a interação com o ligante ocorre extracelularmente. Também há receptores intracelulares, conhecidos como

receptores nucleares, localizados no núcleo ou no citoplasma, que necessitam de ligantes que possam atravessar a membrana plasmática ou ser carregados por moléculas transportadoras (75).

Os receptores nucleares funcionam como fatores de transcrição que ao serem ativados por ligantes interagem com regiões específicas do DNA regulando a expressão de genes responsáveis por diversos processos fisiológicos como o metabolismo, homeostase, reprodução e crescimento. Dessa forma, consistem em alvos farmacológicos importantes para a descoberta de novas drogas (76). A superfamília dos receptores nucleares compreende os receptores de esteroides, de hormônios tireoidianos, de vitaminas, ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) e outros (58).

Em relação a estrutura, os receptores nucleares são proteínas modulares com três domínios funcionais principais. O terminal amino, de tamanho e composição variável entre os membros de receptores nucleares, possui uma função de ativação autônoma, denominada AF-1, independente do ligante e reconhecida por co-ativadores e outros fatores de transcrição. O domínio de ligação ao DNA (DBD) que possui dois dedos de zinco capazes de reconhecer regiões específicas do DNA. E, na região carboxi-terminal, o domínio de ligação ao ligante (LDB) possui a função de ativação, denominada AF-2, dependente do ligante. Além disso, o LDB também possui sítios de interação com co-reguladores e participa na dimerização do receptor (75,77).

No caso dos PPARs, o funcionamento ocorre na forma de heterodímero com o receptor X retinoide (RXR). Após serem ativados por ligantes, os receptores ligam-se ao elemento responsivo de proliferadores de peroxissoma (PPRE), uma região específica do DNA, e passam pela dimerização com o RXR. Então, o heterodímero recruta moléculas coativadoras acarretando a ativação da transcrição do gene alvo (78,79).

Os ligantes naturais dos PPARs são substratos derivados de lipídios e a função principal destes receptores envolve o metabolismo de glicose e lipídios. Até o momento foram identificadas três isoformas que possuem diferentes localizações e funções (78,79). O PPAR- $\alpha$  está associado principalmente com a oxidação de ácidos graxos, é expresso no fígado e em menor extensão no músculo e tecido adiposo. O PPAR- $\delta/\beta$  está bem distribuído em todos os tecidos e participa da regulação do gasto

energético. Por fim, o PPAR- $\gamma$  é expresso em células endoteliais, células do músculo liso vascular, no tecido adiposo e outros. Sua função principal está associada aos processos de armazenamento de lipídios (58,79,80).

### **2.2.1 Receptores ativados por proliferador de peroxissoma $\gamma$**

Atualmente, o PPAR- $\gamma$  é o mais estudado entre as três isoformas e é o alvo terapêutico da classe de medicamentos tiazolidinedionas (TZD), que são agonistas totais desse receptor, utilizados para o tratamento de diabetes tipo II. A ativação do PPAR- $\gamma$  promove a sensibilização à insulina nos tecidos periféricos por ocasionar o aumento do número de adipócitos e a realocação e armazenamento dos ácidos graxos no tecido adiposo, protegendo os tecidos periféricos da lipotoxicidade, evitando a resistência à insulina (43,52). O aumento da sensibilidade devido a ativação do receptor também pode ser explicado pela elevação da expressão de adiponectina, que estimula o transporte de glicose para o músculo e promove a oxidação de ácidos graxos (52).

Contudo, as TZDs estão frequentemente envolvidas com problemas de segurança devido aos seus efeitos adversos graves. A troglitazona, por exemplo, foi retirada do mercado por causa da alta toxicidade no fígado, enquanto a rosiglitazona foi retirada por estar associada com elevado risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A pioglitazona, apesar de oferecer menor risco cardiovascular, está associada com câncer na bexiga e fraturas dos ossos ((81–83).

Além da eficácia no tratamento de diabetes tipo II, a literatura tem evidenciado efeitos benéficos dos agonistas de PPAR- $\gamma$  em diversas outras doenças metabólicas, como as doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, doença inflamatória renal, esclerose múltipla e demais doenças crônicas que envolvem um estado inflamatório geral. Estes estudos demonstraram em diferentes modelos animal que estes efeitos eram resultantes de mecanismos anti-inflamatórios sistêmicos. Foi observado a diminuição da expressão de fatores de transcrição e de citocinas pró-inflamatórias (43,84–86). Além disso, alguns artigos também demonstram que o efeito anti-inflamatório também contribui para a atividade terapêutica das TZDs no tratamento da diabetes tipo II (87–89).

O efeito anti-inflamatório da ativação do PPAR- $\gamma$  pode ocorrer indiretamente pela alteração do metabolismo de lipídios. Uma vez que o aumento de ácidos graxos livres pode resultar na indução de estresse oxidativo, produção de mediadores inflamatórios e reatividade vascular, a ação do PPAR- $\gamma$  na realocação e armazenamento destes ácidos graxos pode contribuir com a redução do processo inflamatório (13,14).

O PPAR- $\gamma$  também pode atuar na inflamação de forma direta por um mecanismo de transrepressão dependente de ligante. No processo de transrepressão o receptor PPAR- $\gamma$  ligado é conjugado com uma proteína modificadora do tipo ubiquitinina (SUMO), assim ele não é capaz de ligar-se ao receptor RXR para a formação do heterodímero. O receptor sumoilado se liga ao complexo repressor localizado no promotor de genes inflamatórios e impede a degradação deste complexo. Como consequência, a repressão de genes inflamatórios como o fator nuclear Kappa B (NF-KB) e da proteína ativadora 1 (AP-1) é mantida, inibindo sua atividade transcricional (13,43,90,91).

### **2.2.2 Receptores ativados por proliferador de peroxissoma $\alpha$**

O PPAR- $\alpha$  é o principal modulador da biossíntese e catabolismo de ácidos graxos livres no fígado. Ele é responsável por aumentar a transcrição de genes envolvidos no transporte intracelular dos ácidos graxos para os peroxissomos e mitocôndrias, para que ocorra o processo de  $\beta$ -oxidação. Durante um processo de jejum, por exemplo, o catabolismo dos ácidos graxos promovido pelo PPAR- $\alpha$  é essencial para a síntese de metabólitos utilizados como fonte de energia. E além de contribuir com a redução das lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e muito baixa (VLDL), e dos triglicerídeos, o PPAR- $\alpha$  também contribui com o aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) devido ao aumento da expressão dos genes das apolipoproteínas I e II (92,93).

Em relação a inflamação, o PPAR- $\alpha$  age por meio de diferentes mecanismos. Assim como no caso do PPAR- $\gamma$ , que contribui indiretamente com a redução do processo inflamatório, a ação do PPAR- $\alpha$  na redução do colesterol e triglicerídeos também é benéfica, uma vez que a alta concentração de ácidos graxos no sangue

favorece um estado pró-inflamatório geral, com aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (94–96).

A relação do PPAR- $\alpha$  com a inflamação foi identificada pela primeira vez por meio de estudos dos efeitos do leucotrieno B<sub>4</sub> em camundongos sem o gene do PPAR- $\alpha$ . O LTB<sub>4</sub>, que funciona como um agente quimiotático para os leucócitos e promove o aumento da permeabilidade vascular, é um potente agonista deste receptor. A interação dos dois ocasiona um mecanismo de *feedback*, restringindo a ação do LTB<sub>4</sub> e, conseqüentemente, reduzindo os sintomas inflamatórios. Dessa forma, o PPAR- $\alpha$  pode proteger contra uma resposta inflamatória exacerbada e contra a transição para um estado crônico (93,97).

A atuação direta do PPAR- $\alpha$  na inflamação também ocorre por meio de diferentes mecanismos de transrepressão. Um exemplo é a interação direta com a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e com a subunidade c-Jun da AP-1, inibindo a transcrição de genes pró-inflamatórios (92,93,98).

Os fibratos são os agonistas sintéticos do receptor PPAR- $\alpha$ , são utilizados para o tratamento de hipertrigliceridemia por conseguir reduzir os triglicerídeos e aumentar HDL de forma concomitante. Eles são capazes de reduzir a ocorrência de infartos do miocárdio e as mortes por doenças cardiovasculares (99). Os efeitos adversos mais importantes relatados para essa classe de medicamentos são a miopatia e a rabdomiólise, que apesar de não serem tão frequentes, são efeitos graves (100,101).

### 2.3 PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA MEDICAMENTOSA

A medicina tradicional é um recurso de saúde que tem como base a experiência, conhecimento e práticas de longo tempo de diversas culturas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a inclusão da medicina tradicional e complementar nos sistemas de saúde e acredita que a realização destas práticas

com segurança e qualidade podem suprir a necessidade das comunidades de uma atenção primária sustentável e culturalmente sensível. Além disso, considera especialmente importante como ferramenta de prevenção e manejo de doenças crônicas relacionadas ao estilo de vida (102,103).

As plantas medicinais e fitoterápicos são um dos recursos da medicina tradicional e complementar mais utilizados no Brasil e no mundo. As razões para a crescente busca destes produtos incluem a acessibilidade, a influência cultural, a maior sensação de segurança e o aumento do conhecimento científico (103,104).

As plantas produzem uma variedade de metabólitos secundários que são substâncias químicas necessárias para a sua adaptação às situações de estresse no ambiente. Além disso, estes metabólitos são os responsáveis pela atividade terapêutica e têm sido amplamente estudados e utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos. Inclusive, substâncias isoladas de plantas representaram descobertas de novas possibilidades de intervenção terapêutica e possibilitaram a síntese de fármacos com estrutura mais complexa (105,106). Assim, com uma grande variedade de compostos com potencial anti-inflamatório, as plantas medicinais possuem papel de destaque na busca por novas drogas que possam auxiliar no tratamento de doenças relacionadas à inflamação.

### **2.3.1 Morus nigra**

O gênero *Morus*, pertencente à família Moraceae, compreende espécies conhecidas popularmente como amoreiras, distribuídas no mundo em regiões quentes, tropicais e subtropicais. As espécies *Morus nigra*, *Morus alba* e *Morus rubra* são relatadas com maior frequência e amplamente cultivadas devido sua importância econômica, nutricional e medicinal (107,108).

Os frutos de sabor adocicado dessas espécies são utilizados como alimento, tanto *in natura* como para a produção de sucos, geleias, vinhos, iogurtes, sorvetes e outros. Inclusive, o uso *in natura* dos frutos é encorajado devido ao valor nutricional e propriedade antioxidante e anti-inflamatória (109,110). Na sericultura, que consiste na criação das larvas de *Bombyx mori* L. (bicho-da-seda) para a produção dos fios de

seda utilizado nos tecidos, as amoreiras possuem grande valor econômico por suas folhas serem o alimento principal das larvas (111).

No Brasil, a importância medicinal do gênero foi reconhecida por meio da sua presença na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS). A RENISUS tem o intuito de orientar estudos para identificar demandas e contribuir com a assistência farmacêutica. Na lista constam 71 espécies vegetais e o gênero *Morus spp.* aparece com a observação de que as espécies devem ser definidas conforme estudos, cultivo e indicações de uso (112). Para dar continuidade a estudos anteriores realizados neste grupo de pesquisa e devido ao histórico de uso tradicional e resultados promissores encontrados na literatura, a espécie *Morus nigra* L. foi escolhida como foco deste trabalho.

A espécie *M. nigra*, nativa da Ásia e bem aclimatizada no Brasil, é caracterizada por árvores de médio porte, atingindo de 8 a 12 metros de altura com folhas de coloração verde escura, de superfície rugosa, margem serrilhada, base arredondada e ápice acuminado. O período de frutificação ocorre principalmente na primavera quando surgem folhas novas. As infrutescências são ovaladas e de coloração roxo-escuro quando maduras (107,113).



Figura 1 - Árvore de *Morus nigra* em período de frutificação. Fonte: da autora

As folhas são constituídas principalmente de compostos fenólicos, sendo a quercetina e o ácido clorogênico relatados como majoritários com maior frequência (114–119). Além destes, a isoquercitrina, o kaempferol, a rutina e o ácido *p*-cumárico são frequentemente relatados para esta espécie (20–22,114–118). Também há a presença de ácido cafeico (114,115,117), ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico (116), ácido elágico (114,115), ácido vanílico (115,119), ácido siríngico (115,120), ácido gálico, resveratrol (114,118), hisperidina (21),  $\beta$ -sitosterol (22) e catequina (117,118).

Ressalta-se que estudos comparativos da composição química das espécies correlatas *M. nigra*, *M. alba* e *M. rubra* demonstraram um teor de compostos fenólicos superior para a espécie *M. nigra*, associando também uma maior atividade antioxidante por diferentes métodos (115,121).

Tradicionalmente, as folhas da espécie *Morus nigra*, conhecida como amora, amoreira negra ou amora miúra, são utilizadas principalmente na forma de chá como laxativo (18,122), como calmante (123), para o tratamento de sintomas do climatério (15,123–126), tratamento de hipertensão (123,126), diminuição de dores em geral (17,122,123), emagrecimento (16,17,123,126), diminuição do colesterol (17,124) e para o controle de diabetes (18,19,122,124).

Os estudos pré-clínicos e clínicos realizados com o extrato das folhas sugerem sua eficácia principalmente como antioxidante, para o controle de diabetes e para a redução do colesterol.

A capacidade antioxidante foi avaliada por diferentes métodos *in vitro* como a captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (116,118,121,127) e a captura do radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (116,127). Foi avaliada também em estudos *in vivo*, utilizando amostras de plasma, tecido hepático, tecido renal ou tecido cerebral de camundongos com diferentes condições (com sepse (128), hiperlipidêmicos (118), chagásicos (129), com comportamento depressivo (120) e com disfunções cognitivas (119)) utilizando os métodos de avaliação da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (119,128), das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (118–120,129), e da recuperação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (119,129).



A maioria dos resultados sugerem uma capacidade antioxidante significativa quando comparado com os controles, porém, no estudo com ratos infectados com *Trypanosoma cruzi*, o extrato das folhas de *M. nigra* apenas reduziu a peroxidação lipídica e recuperou os níveis de GSH no grupo de ratos não infectados. Enquanto o grupo de camundongos infectados não apresentou diferença significativa entre os tratados e não tratados (129).

Os efeitos do extrato para o controle da diabetes foram testados *in vitro* por meio dos ensaios de inibição da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase (127) e *in vivo* utilizando ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (21,130) ou aloxana (128,131). No estudo *in vitro*, o extrato foi capaz de inibir a  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase de maneira dose-dependente (127) e nos estudos *in vivo*, foi demonstrado a capacidade do extrato de aumentar os níveis de insulina, reduzir a glicose, prevenir os danos hepáticos e renais causados pela diabetes e melhorar o perfil lipídico, diminuindo colesterol de baixa densidade (LDL) e aumentando o colesterol de alta densidade (HDL) (21,128,130,131).

Em camundongos pré-diabéticos o extrato de *M. nigra*, foi capaz de reduzir a progressão para a diabetes tipo II. Houve uma melhora na resistência à insulina, manutenção da homeostase intestinal e redução de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- $\alpha$  (132)

Outro estudo realizado com camundongos hiperlipidêmicos também demonstrou a capacidade do extrato em melhorar o perfil lipídico, sugerindo a eficácia do extrato para o tratamento de dislipidemias (118). Além disso, a hepatoproteção do extrato foi observada em camundongos com hepatotoxicidade induzida por metotrexato. Além de diminuir os danos causados ao fígado, houve redução dos níveis das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), fosfatase alcalina e lactato desidrogenase (133).

Também há estudos relacionados à distúrbios cognitivos comportamentais. O tratamento de camundongos com o extrato das folhas de *M. nigra* resultou em um menor período de imobilidade nos testes comportamentais de suspensão pela cauda, natação forçada e campo aberto, sugerindo a eficácia antidepressiva do extrato (120). Em camundongos com comprometimento cognitivo induzido por D-galactose, a administração do extrato foi capaz de melhorar o aprendizado e aumentar a retenção

de memória, indicando um potencial efeito no atraso dos processos neurodegenerativos (119).

A atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foi sugerida em um estudo realizado com camundongos apresentando edema de pata induzido pelo veneno da cobra *Bothrops jararacussu*. O tratamento reduziu o edema, a dor e a infiltração de leucócitos, o mesmo ocorreu para edemas induzidos por serotonina, bradicinina e carragenina (22). Além disso, camundongos com sepse induzida por LPS e tratados com o extrato de *M. nigra* tiveram maior taxa de sobrevivência comparado com o controle, apresentaram redução do número de células inflamatórias e do TNF- $\alpha$ , mas não alterou a citocina IL-1 $\beta$  (134).

A literatura apresenta apenas um estudo clínico com as folhas da espécie *M. nigra*. A eficácia de cápsulas contendo 250 mg do pulverizado das folhas foi testada em mulheres com síndrome climatérica. No estudo, foi observado uma melhoria dos sintomas climatéricos no grupo que recebeu o a cápsula com as folhas de amora comparado com o grupo placebo e o grupo que recebeu terapia hormonal. Entretanto, ao contrário do que foi observado nos estudos pré-clínicos, não houve efeito hipoglicemiante e nem hipolipidêmico (135).

Em relação a toxicidade, a avaliação da administração aguda do extrato na dose de 2000 mg/kg em ratos, não resultou na morte dos animais e não foram observados efeitos tóxicos, o mesmo foi concluído para a administração subaguda do extrato nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg por 28 dias (117). No ensaio clínico, a administração da cápsula contendo 250 mg do pulverizado das folhas, durante 60 dias, também não resultou em efeitos adversos e tóxicos (135).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra* L em cultivo celular. Além disso, investigar a ativação de receptores nucleares relacionados com a atividade anti-inflamatória.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra* L;
- Identificar e quantificar compostos majoritários por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Determinar a citotoxicidade do extrato em células de macrófago murino (RAW 264.7) e em células de adenocarcinoma humano (HeLa) pelo método de redução do MTT;
- Avaliar a capacidade do extrato e seus compostos majoritários em aumentar a atividade transcricional de receptores nucleares por meio do ensaio gene-repórter da luciferase.
  - Receptor PPAR- $\gamma$ ;
  - Receptor PPAR- $\alpha$ ;
  - Receptor Tr $\beta$ .
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato em células RAW 264.7 com inflamação induzida por LPS:
  - Dosagem de espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato em células de macrófago estimuladas com LPS:
  - Dosagem de óxido nítrico pelo método do reagente de *Griess*;
  - Dosagem de TNF- $\alpha$  por kit de ELISA;
- Avaliar a influência da ativação dos receptores PPAR na atividade anti-inflamatória do extrato, por meio do tratamento simultâneo das células inflamadas com o extrato e os antagonistas específicos de PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$ .

## 4 MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da espécie vegetal *Morus nigra* L. foram coletadas nos dias 23 e 24 de outubro de 2017, das 14 às 15 horas, no Condomínio Solar de Brasília (15° 51' 2" S, 47° 48' 48" O), localizado em Brasília – DF. O céu estava nublado, a temperatura registrada no momento da coleta variou em torno de 30 a 32°C e a umidade relativa do ar entre 22 e 27% (136). A espécie encontrava-se no seu período de frutificação.

O material botânico foi identificado pelo botânico Prof. Dr. Christopher W. Fagg do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, conforme o voucher da espécie (Fagg CW 2302) depositado no Herbário da Universidade de Brasília.

O acesso ao patrimônio genético foi aprovado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen), registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGen) sob o número A215A9A.

### 4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O preparo do extrato foi realizado conforme descrito por Freitas *et al* (2016) (20). As folhas foram secas artificialmente em estufa com circulação e renovação de ar (SOLAB - modelo SL – 102), à temperatura de 37°C até atingir teor de umidade entre 8 e 14%, conforme o guia da Anvisa para a registro de fitoterápicos (137). A análise do teor de umidade das folhas foi realizada em triplicata com amostras de 1g, por meio da perda por dessecação, utilizando o analisador de umidade por infravermelho (Gehaka, modelo IV2000, São Paulo/SP, Brasil).

Após a secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas (Marconi – modelo: MA 580) e tamisadas em agitador eletromagnético de peneiras para análises granulométricas (Bertel – Caieiras/SP, Brasil). Foram utilizadas peneiras com aberturas de 500 µm (Mesh 32), 125 µm (Mesh 115) e 63 µm (Mesh 250). O reostato

foi ajustado para nível 5 de vibração e o material botânico foi tamisado por dois minutos. Para dar continuidade ao processo de obtenção do extrato, foram utilizadas apenas as partículas entre 63 e 500  $\mu\text{m}$ .

A extração ocorreu por maceração passiva a frio, na proporção de 1:5 m/v, utilizando 95% de etanol e 5% de água destilada como solvente extrator. O pulverizado foi dividido igualmente em dois recipientes (734,11g em cada recipiente) e foi adicionado 3670 mL de etanol 95%. Os recipientes foram mantidos à temperatura ambiente ao abrigo de luz e agitados manualmente, diariamente, durante 10 dias (20).

Depois do processo de maceração, o extrato foi filtrado e os filtros foram lavados com quantidade suficiente de etanol 95% até completar o volume inicial. O extrato filtrado foi concentrado em evaporador rotativo (Heidolph Instruments, Schwabach - Alemanha) acoplado com refrigerador (Heidolph Instruments, MX07R-20-HD2E, Schwabach - Alemanha) e bomba de vácuo (Heidolph Instruments D-91126, Schwabach - Alemanha), com temperatura mantida à 40°C e rotação de 100 rpm. O extrato concentrado foi transferido para um frasco protegido da luz e mantido em banho maria (Quimis Aparelhos Científicos, Q334M-28, Diadema-SP, Brasil) à 40°C para a secagem do solvente residual.

Após a secagem, o extrato foi mantido em freezer -80°C, depois congelado em nitrogênio líquido e então, liofilizado (liofilizador K 105 - Liotop®).

#### 4.3 TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS

A determinação do teor de sólidos totais foi realizada em triplicata com alíquotas de dois mL do extrato filtrado (anterior a concentração em evaporador rotativo). Foi utilizado o analisador de umidade por infravermelho (Gehaka, modelo IV2000, São Paulo/SP, Brasil), ajustado para a determinação de sólidos totais, na função *Auto-dry* e pré-aquecido a 100°C.

#### 4.4 RENDIMENTO

O rendimento do processo extrativo das folhas de *M. nigra* foi calculado em porcentagem relacionando a massa do extrato após liofilização com a massa das folhas pulverizadas, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do extrato final (g)} \times 100}{\text{massa das folhas pulverizadas (g)}}$$

#### 4.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES FITOQUÍMICOS

A avaliação da presença dos marcadores fitoquímicos ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises foram realizadas com o cromatógrafo LaChrom Elite (Hitachi, Tóquio, Japão) equipado com injetor L2200, bomba L2130, forno para coluna L2300, mantido a 25°C, coluna PurospherStar RP C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Merck, Germany) acoplada a pré-coluna de mesmas características, e detector de arranjo de diodos (DAD) L2455, ajustado na faixa de 230 a 400nm, sendo os cromatogramas extraídos no comprimento de onda de 354nm. As condições de análise foram conforme o estudo de Freitas *et al* (2016). A fase móvel consistiu em um gradiente de ácido fosfórico 1% e acetonitrila (Tabela 1) com fluxo de 0,5 mL por minuto.

Tabela 1 - Gradiente de eluição da análise por CLAE-DAD

Tempo (min)	Ácido fosfórico 1% (%)	Acetonitrila (%)
0	90	10
40	70	30
45	90	10

As amostras do extrato foram preparadas em triplicata na concentração de 4 mg/mL em metanol e filtradas com filtro de 0,45 µm (Millex, Merck Millipore). Os padrões rutina, isoquercitrina e ácido clorogênico (Sigma-Aldrich®) foram preparados na concentração de 100 µg/mL, também em metanol e filtrados. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL. Todos os solventes utilizados na análise foram de grau

HPLC, obtidos da Tedia<sup>®</sup>, e a água utilizada foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore).

Os dados foram obtidos com o software EZChrom Elite (version 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.). As substâncias presentes no extrato foram identificadas por meio da comparação com os padrões (tempo de retenção e espectro similares) e foram quantificadas conforme a fórmula seguinte:

$$Teor (\mu g/mg) = \frac{A_A \times C_P}{A_P}$$

Em que:

$A_A$  = Área da amostra

$C_P$  = Concentração do padrão

$A_P$  = Área do padrão

O valor encontrado foi ajustado conforme as diluições realizadas.

#### 4.6 CULTIVO CELULAR

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular de macrófago murino, RAW 264.7, e a linhagem de adenocarcinoma humano, HeLa, provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB. As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular de 75 cm<sup>2</sup>, estéreis, apirogênicas e livres de DNase e RNase, com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Gibco Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>) suplementado com soro fetal bovino (SFB - Gibco Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>) 10%, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma<sup>®</sup>), piruvato de sódio (Sigma<sup>®</sup>) 1mM, e 1% de solução de antibióticos contendo estreptomicina e penicilina (Sigma<sup>®</sup>). As garrafas foram mantidas em incubadora à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Os ensaios foram realizados apenas após a terceira passagem depois do descongelamento das células, sendo descartadas na décima passagem.

#### 4.6.1 Citotoxicidade do extrato

A avaliação da citotoxicidade do extrato foi realizada para as duas linhagens celulares (RAW 264.7 e HeLa) e ocorreu conforme o método da redução do reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT; Sigma-Aldrich®), descrito por Mosmann (1983) (138), com adaptações. No ensaio com as células RAW 264.7, o extrato foi testado com e sem a estimulação das células com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS – Sigma Aldrich).

Primeiramente, as células suspensas em meio DMEM completo foram semeadas em placa de 96 poços, na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço no ensaio com células RAW 264,7, e  $0,8 \times 10^4$  no ensaio com as células HeLa, com volume final de 200  $\mu$ L. A placa foi mantida por 24h em incubadora à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a adesão das células à placa. Após este período, o meio de cultivo foi retirado da placa cuidadosamente e foi acrescentado 200  $\mu$ L do tratamento por poço. Quando o teste foi realizado nas células estimuladas com LPS, este foi acrescentado aos poços na concentração de 1  $\mu$ g/mL após 3h do início do tratamento. A placa foi incubada novamente por mais 24h.

O tratamento foi constituído por uma curva em triplicata, preparada em diluição seriada, do extrato hidroetanólico de *M. nigra* (EHMN). As concentrações do extrato foram de 1000, 800, 600, 500, 400, 200, 100, e 50  $\mu$ g/mL. O extrato foi solubilizado em metanol e meio DMEM completo, sendo o metanol utilizado em quantidades que não ultrapassassem 2% na concentração final do poço.

Além do tratamento, também foram preparadas triplicatas com controle do veículo e controle positivo. O controle do veículo foi realizado para verificar a interferência do metanol no ensaio e consistiu em metanol 2% e DMEM completo. No controle positivo, as células não receberam o tratamento, sendo substituído apenas por DMEM completo.

Ao final das 24h de tratamento, o conteúdo dos poços foi retirado cuidadosamente para que não ocorresse a retirada de células aderidas ao poço. Foi acrescentado 50  $\mu$ L de MTT a 1 mg/mL, solubilizado em meio DMEM incolor (Gibco



Thermo Fisher Scientific®). A placa foi incubada por 4h e, após esse período, foi acrescentado 150 µL de solução de isopropanol acidificado. O conteúdo dos poços foi devidamente homogeneizado e as absorvâncias foram determinadas a 570 nm por leitor de microplacas (Multimode plate reader - EnSpire®, PerkinElmer do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil).

Para descontar a coloração dos reagentes, também foi realizado um branco em triplicata que foi constituído por 50 µL da solução de MTT e 150 µL de isopropanol acidificado.

A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle positivo (100% de viabilidade), descontando a coloração do reagente MTT (branco) conforme a fórmula a seguir:

$$\text{células viáveis (\%)} = \frac{\text{Abs}_A - \text{Abs}_B}{\text{Abs}_C - \text{Abs}_B} \times 100$$

Em que:

$\text{Abs}_A$  = média da absorvância da amostra

$\text{Abs}_B$  = média da absorvância do branco

$\text{Abs}_C$  = média da absorvância do controle positivo

A interação direta do extrato com o reagente MTT, sem a presença de células, durante 24h, também foi testada para eliminar a possibilidade de resultados falsos.

#### **4.6.2 Ensaio do gene repórter da Luciferase**

Para o ensaio do gene repórter as células HeLa foram semeadas em placa de 48 poços na concentração de  $4 \times 10^4$  células/poço em meio DMEM com 10% de SFB e sem antibióticos. As células foram incubadas por 24h e após esse período foram submetidas à transfecção para a inserção dos plasmídeos contendo o receptor nuclear de interesse e o elemento responsivo (luciferase) no núcleo.

A transfecção foi realizada com o reagente lipofectamina (Lipofectamine 2000 transfection reagent – Thermo Fisher, Invitrogen) segundo o protocolo do fabricante com adaptações. As células foram transfectadas com uma solução de lipossomos formados com 60 ng do receptor nuclear (PPAR- $\gamma$ , PPAR- $\alpha$  ou TR $\beta$ ), 240 ng do elemento responsivo LUC e 0,5  $\mu$ L de lipofectamina em DMEM sem SFB e sem antibióticos.

Os plasmídeos utilizados foram: I) cDNA para o receptor PPAR- $\gamma$  humano (pCMV-SPORT6-PPAR $\gamma$ ) com elemento responsivo fundido com o gene repórter da luciferase; II) PPAR- $\alpha$  LDB fundido com o domínio de ligação ao DNA do Gal4. Estes plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Webb do Methodist Research Institute, Texas, Estados Unidos.

Após 6 horas de incubação em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, o conteúdo do poço foi retirado e adicionou-se o tratamento com o extrato de *M. nigra*, rutina (Sigma), isoquercitrina (Sigma). Para cada receptor foi utilizado como controle o respectivo agonista, todos obtidos da empresa Sigma. Adicionalmente, para os receptores PPAR, também foi testado o respectivo antagonista concomitante com o agonista ou extrato. Os tratamentos e respectivas concentrações estão representados nos Quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1 - Tratamentos e concentrações do ensaio do PPAR- $\gamma$

<b>Tratamento</b>	<b>Concentrações</b>
Veículo	DMEM com 1% de etanol e 0,1% de DMSO
Rosiglitazona (agonista)	1x10 <sup>-5</sup> M
GW 9662 (antagonista)	1x10 <sup>-5</sup> M
Rosiglitazona + GW 9662	1x10 <sup>-5</sup> M; 1x10 <sup>-5</sup> M
EHMN + GW 9662	300 $\mu$ g/mL; 1x10 <sup>-5</sup> M
EHMN	50, 100, 200, 300 ou 400 $\mu$ g/mL
Rutina	0,187; 0,374; 0,748; 1,122 ou 1,496 $\mu$ g/mL
Isoquercitrina	0,296; 0,592; 1,184; 1,776 ou 2,368 $\mu$ g/mL
Rutina + Isoquercitrina	1,122 $\mu$ g/mL; 1,776 $\mu$ g/mL

Quadro 2 - Tratamentos e concentrações do ensaio do PPAR- $\alpha$ 

Tratamento	Concentrações
Veículo	DMEM com 1% de etanol e 0,1% de DMSO
WY 14642 (agonista)	$1 \times 10^{-5}$ M
GW 6471 (antagonista)	$1 \times 10^{-4}$ M
WY 14642 + GW 6471	$1 \times 10^{-5}$ M; $1 \times 10^{-4}$ M
EHMN + GW 6471	300 $\mu\text{g/mL}$ ; $1 \times 10^{-4}$ M
EHMN	50, 100, 200, 300 ou 400 $\mu\text{g/mL}$
Rutina	0,187; 0,374; 0,748; 1,122 ou 1,496 $\mu\text{g/mL}$
Isoquercitrina	0,296; 0,592; 1,184; 1,776 ou 2,368 $\mu\text{g/mL}$
Rutina + Isoquercitrina	1,122 $\mu\text{g/mL}$ ; 1,776 $\mu\text{g/mL}$

Quadro 3 - Tratamentos e concentrações do ensaio do TR $\beta$ 

Tratamento	Concentrações
Veículo	DMEM com 1% de etanol e 0,1% de DMSO
Triiodotironina (T <sub>3</sub> ) – agonista	$1 \times 10^{-6}$ M
EHMN	50, 100, 200, 300 ou 400 $\mu\text{g/mL}$

Depois de 24h de tratamento, as células foram lisadas com tampão de lise e 10  $\mu\text{L}$  do lisado foram inseridos em um microtubo translúcido. Cada microtubo recebeu 20  $\mu\text{L}$  do substrato para a enzima luciferase (luciferina – Sigma-Aldrich®) e a emissão da luz resultante da reação entre a luciferina e a luciferase foi quantificada em luminômetro (GloMax 20/20 luminometer – Promega).

O cálculo da taxa de atividade da transcrição foi realizado pela razão entre a leitura das células tratadas com o ligante (extrato ou o controle positivo) e a leitura das células tratadas com o veículo, conforme equação representada abaixo. Os dados representam média de três experimentos realizados em triplicata.

$$\text{Taxa de ativação} = \frac{\text{leitura das células tratadas com o ligante}}{\text{leitura das células tratadas com o veículo}}$$

#### 4.6.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi avaliada pelo método da diclorofluoresceína descrito por Wang e Joseph (1999) (139), que se torna fluorescente após a oxidação por ERO. As células RAW 264.7 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células por poço e tratadas no dia seguinte com o extrato de *M. nigra* nas concentrações de 400, 300, 200, 100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Após 3 horas de tratamento, foi acrescentado  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS em cada poço. O controle positivo foi constituído de células estimuladas com LPS e tratadas apenas com veículo. Enquanto o controle negativo foram células não estimuladas e tratadas apenas com veículo.

Depois de 24 horas, o tratamento foi retirado, os poços foram lavados com solução tampão fosfato-salino e foi acrescentado o reagente 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA – Sigma-Aldrich) na concentração de  $40 \mu\text{M}$ . Após 30 minutos de incubação na estufa de  $\text{CO}_2$  à  $37^\circ\text{C}$ , o reagente foi retirado e acrescentado tampão PBS. A leitura da fluorescência foi realizada em leitora de microplacas ajustada em 485 nm de excitação e 535 nm de emissão.

A placa foi guardada em freezer de  $-80^\circ\text{C}$  para posterior quantificação de proteínas com o kit de ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific). A quantificação com o kit foi realizada seguindo as instruções da bula e a leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas ajustada em 562nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações de 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ .

As leituras de fluorescência das ERO foram normalizadas por mg de proteína conforme resultados da quantificação com kit de BCA.

#### 4.6.4 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi realizada conforme o método de Griess (140). As células RAW 264.7, suspensas em meio DMEM completo, foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  por poço com volume total de um mL. A placa foi mantida em incubadora à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Após, o meio foi retirado e acrescentado o DMEM incolor (sem vermelho de fenol) com 5% de SFB contendo o tratamento com o extrato nas concentrações de 50, 75, 100, 150 ou 200 µg/mL. Depois de 3h, foi acrescentado LPS na concentração de 1µg/mL em cada poço.

Para o controle positivo, no lugar do tratamento, as células foram mantidas apenas com DMEM incolor e estimuladas com LPS. Enquanto o controle negativo prosseguiu sem a estimulação com LPS. O branco dos extratos e dos controles consistiu em todas as etapas semelhantes às amostras, porém sem células. Adicionalmente, o tratamento com o extrato na concentração de 200 µg/mL foi testado concomitantemente ao antagonista dos receptores PPAR- $\gamma$  (GW9662) e PPAR- $\alpha$  (GW6471).

Ao final de 48h de tratamento, 100 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para uma placa de 96 poços. Foi acrescentado a cada poço mais 100 µL do reagente de Griess (Sigma Aldrich). Após 10 minutos de reação, foi realizada a leitura em leitor de placas com comprimento de onda ajustado para 540 nm.

A concentração de óxido nítrico foi calculada a partir da curva padrão de nitrito de sódio nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 e 0,09 µM. Além da concentração, os resultados também foram expressos em relação a porcentagem de redução de óxido nítrico em relação ao controle positivo.

#### **4.6.5 Determinação de TNF- $\alpha$**

Para a dosagem da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , as células RAW 264.7 foram semeadas em uma placa de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço. Após 24h de incubação, as células foram tratadas com o EHMN na concentração de 50, 100, 200, 300 ou 400 µg/mL e estimuladas com LPS (1 µg/mL) após 3h. O TNF- $\alpha$  foi determinado utilizando um kit ELISA (Sigma Aldrich), conforme as instruções do fabricante.

Assim como na dosagem de ON, o tratamento com o extrato na concentração de 300 µg/mL foi testado concomitantemente ao antagonista dos receptores PPAR- $\gamma$  (GW9662) e PPAR- $\alpha$  (GW6471).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram representados pela média de três experimentos independentes realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism 6<sup>®</sup>. Os resultados obtidos foram comparados pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações ou pelo teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos. Foi adotado como nível de significância o  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS

O teor de sólidos totais foi determinado por balança de infravermelho, antes da evaporação do extrato, e realizado em triplicata. Foi encontrada a média de 1,67 %  $\pm$  0,15, semelhante à média de 1,63 % encontrada no trabalho de Freitas *et al* (2016).

### 5.2 RENDIMENTO

A massa das folhas pulverizadas utilizadas no processo extrativo foi de 1468,22 g. Ao final do processo, após a liofilização do extrato, foi obtida uma massa de 155,58 g. Assim, o rendimento do extrato hidroetanólico das folhas de *M. nigra* foi de 10,59 %, superior à média do rendimento do extrato preparado da mesma forma, de 7,84 %, no trabalho de Freitas *et al* (2016).

### 5.3 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES FITOQUÍMICOS

A análise por CLAE-DAD foi realizada conforme o método previamente validado para o extrato hidroetanólico das folhas de *M. nigra*. O perfil cromatográfico da amostra foi semelhante ao perfil encontrado no trabalho de Freitas *et al* (20), com quatro picos majoritários, sendo dois deles identificados como rutina (Figura 2, A) e isoquercitrina (Figura 2, B). Estes compostos são frequentemente relatados nas folhas desta espécie (21,22,114–118).

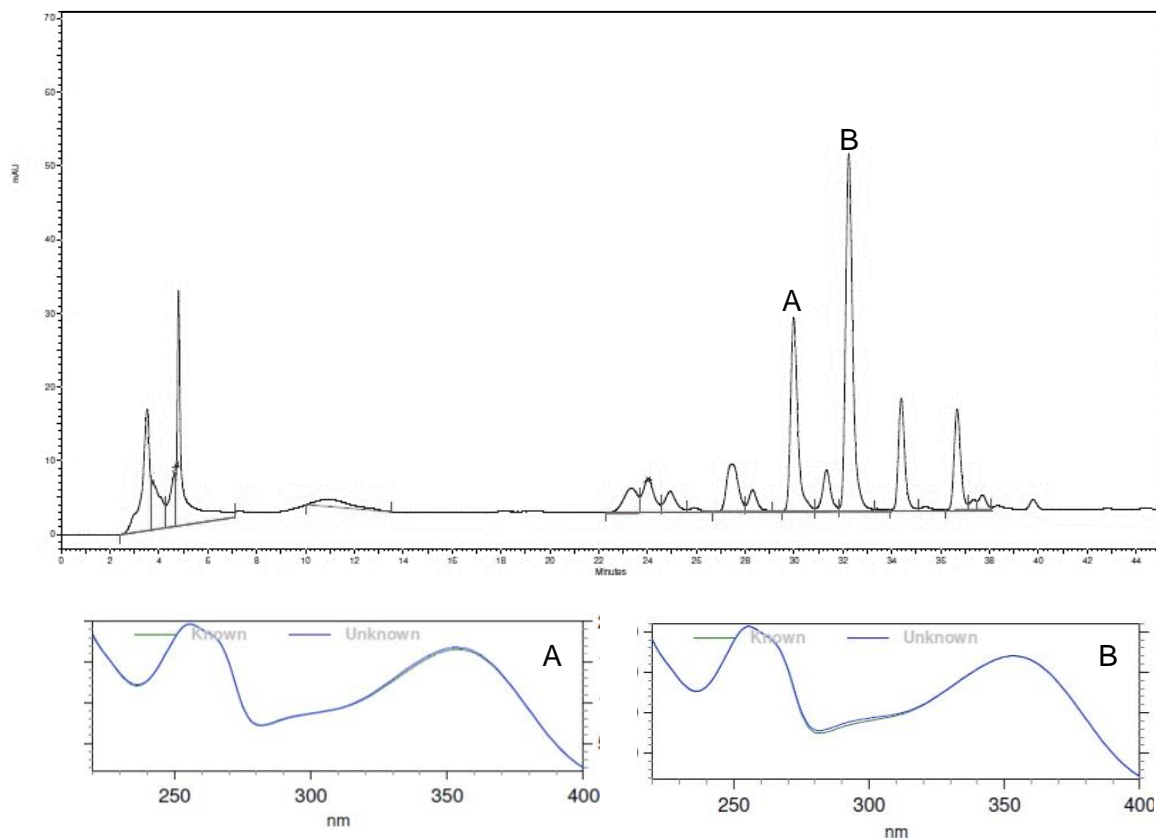


Figura 2 - Cromatograma e espectros do extrato hidroetanólico de *Morus nigra*, obtido por CLAE-DAD. Análise realizada por eluição gradiente com acetonitrila e ácido fosfórico e detecção à 354nm. A: espectro do pico referente à rutina sobreposto ao espectro do padrão; B: espectro do pico referente à isoquercitrina sobreposto ao espectro do padrão.

Em contraste aos outros estudos, que sugerem o ácido clorogênico como composto majoritário (114,116,118,119), mesmo após varredura em outros comprimentos de onda, não foi possível identificar esta substância no extrato. As variações na composição do extrato podem estar associadas ao estágio de desenvolvimento da planta, condições climáticas e período do ano da coleta do material vegetal. Tendo em vista que essas condições alteram o padrão de produção de metabólitos secundários. Além disso, a secagem do material vegetal, tipo de preparo e o solvente extrator podem gerar diferentes perfis fitoquímicos, uma vez que os compostos extraídos dependem da técnica utilizada e da sua afinidade com o solvente (105).

Por meio da comparação com a área da substância padrão, de concentração conhecida, foi possível quantificar o teor das substâncias identificadas. O teor encontrado foi de 3,74  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para rutina e 5,92  $\mu\text{g}/\text{mg}$  para isoquercitrina, próximo aos valores encontrados por Freitas *et al* (20).



Tabela 2 - Resultados da análise por CLAE-DAD do extrato de *Morus nigra*.

	Tempo de retenção (min)	Similaridade com o padrão	Área	Teor ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato) *
Rutina	$29,88 \pm 0,10$	$0,9999 \pm 0,001$	$2062959 \pm 102711$	$3,74 \pm 0,18$
Isoquercitrina	$32,17 \pm 0,06$	$1,0000 \pm 0,000$	$3748534 \pm 186186$	$5,92 \pm 0,29$

\* teor calculado utilizando como referência a área do padrão com tempo de retenção e espectro similar. (Padrão de rutina a  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ : tempo de retenção de  $30,09 \pm 0,10$  e área de  $13807689 \pm 706151$ ; Padrão de isoquercitrina a  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ : tempo de retenção de  $32,29 \pm 0,03$  e área de  $15825734 \pm 66954$ ).

A rutina e isoquercitrina (Figura 3) pertencem ao grupo dos flavonoides, uma classe de polifenóis com grande abundância no reino vegetal. Este grupo é conhecido principalmente pela sua capacidade antioxidante, que é essencial para o auxílio no combate a uma variedade de doenças (105,141). Considerando que as espécies reativas de oxigênio são capazes de induzir a produção de mais mediadores inflamatórios e ainda causar danos celulares, esta capacidade dos flavonoides é relevante no tratamento das doenças de caráter inflamatório. Além disso, estudos sugerem que os flavonoides são potentes inibidores da enzima COX, responsável por catalisar a reação de produção das prostaglandinas na resposta inflamatória (141).

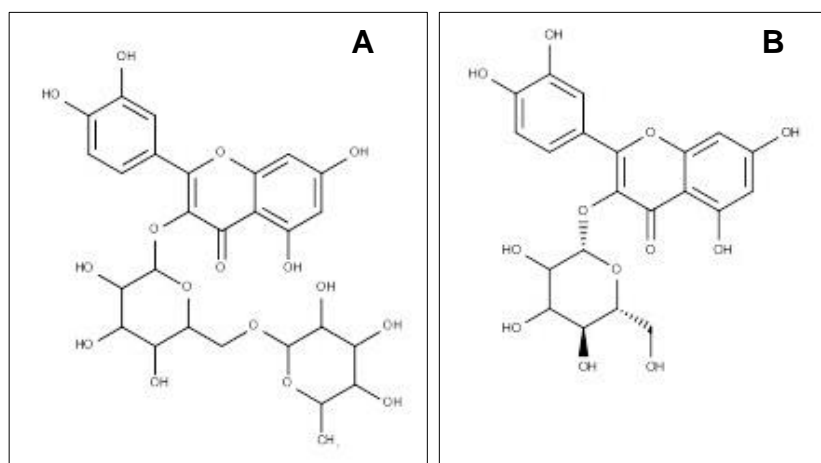


Figura 3 - Estruturas químicas dos flavonoides identificados no extrato de *M. nigra*. A: Rutina; B: Isoquercitrina.

Em um estudo com camundongos, a rutina ocasionou a redução da fibrose hepática, induzida por tioacetamida, por meio da modulação da resposta inflamatória

no fígado. Ela foi capaz de reduzir os mediadores inflamatórios IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-18, provavelmente, pela inibição da via de sinalização dos receptores do tipo *Toll* e do receptor P2X7 (142).

Em células de neutrófilos ativados, a rutina reduziu de forma significativa a produção de TNF- $\alpha$ , de óxido nítrico e da enzima mieloperoxidase (143). Enquanto em ratos com nefrotoxicidade causada pelo medicamento carfilzomibe, a rutina reduziu o estresse oxidativo e a inflamação possivelmente pela inibição da via de sinalização do NF-KB (144). Seus efeitos de redução do estresse oxidativo e como anti-inflamatório também foram visualizados em ratos com neurotoxicidade induzida por fluoreto (145) e em ratos com neuropatia óptica induzida por metanol (146).

A isoquercitrina apresentou efeito hepatoprotetor em camundongos com hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno. Parte deste efeito foi atribuído a redução da produção de iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, pela via do NF-KB (147). Os mesmos efeitos foram observados em camundongos com disfunções cardíacas induzidas pelo LPS (148).

Considerando estes estudos e diversos outros que elucidam a capacidade anti-inflamatória da rutina e da isoquercitrina, os efeitos do extrato poderiam ser atribuídos, pelo menos em parte, à presença destes compostos.

#### 5.4 CITOTOXICIDADE DO EXTRATO

O método de avaliação da viabilidade celular descrito por Mosmann (1983) tem como princípio a redução do reagente MTT, que ocorre apenas em células viáveis, pela coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH), formando cristais de formazan proporcionalmente ao número de células viáveis. Estes cristais são dissolvidos pelo isopropanol resultando em uma coloração violeta (138,149,150). Assim, é possível avaliar a toxicidade de substâncias para um dado tipo celular. Além disso, esta avaliação serve como base para a determinação de concentrações ideais de trabalho em outros ensaios com a linhagem celular utilizada.

Alguns estudos relatam a capacidade dos compostos presentes em alguns extratos vegetais reduzirem o MTT formando cristais de formazan, mesmo sem a presença de células (151,152). Dessa forma, o extrato das folhas de *M. nigra* foi testado na presença do MTT sem as células. Este teste, não demonstrou nenhuma reação, descartando a possibilidade da ocorrência de falsos resultados.

As concentrações do extrato foram consideradas citotóxicas quando houve redução da viabilidade maior que 30%, sendo assim, para os ensaios posteriores foram utilizadas apenas as concentrações que apresentaram viabilidade maior que 70%, conforme recomendado pela norma ISO 10993-5 (153).

O extrato de *M. nigra* apresentou citotoxicidade nas linhagens testadas apenas nas concentrações maiores que 500 µg/mL. Os valores de IC<sub>50</sub> encontrados foram 597,1 ± 103,70 µg/mL para a RAW 264.7 sem estímulo com LPS, 622,2 ± 79,04 µg/mL para a RAW estimulada com LPS e 562,23 ± 32,24 µg/mL para a HeLa.

Mesmo com as células de macrófago em processo inflamatório causado pelo LPS, o extrato manteve o perfil de citotoxicidade semelhante às células não estimuladas, apresentando valor de IC<sub>50</sub> sem diferença estatística em relação às células não estimuladas ( $p > 0,005$  no teste de Mann-Whitney).

A citotoxicidade do extrato das folhas da espécie em questão também já foi testada em outros estudos para as linhagens de melanoma murino (B16F10), queratinócito humano (HaCat), fibroblasto murino (L-929) (20) e câncer de fígado (HepG2) (133). Porém, os valores de IC<sub>50</sub> relatados foram menores (14,5 a 324,2 µg/mL) (20,133). O extrato dos frutos da espécie também já foi testado na linhagem de RAW 264.7 e apresentou baixa toxicidade (154). As diferenças entre os valores de IC<sub>50</sub> podem ser explicadas por variações no método de avaliação ou pelas diferenças entre os extratos avaliados.

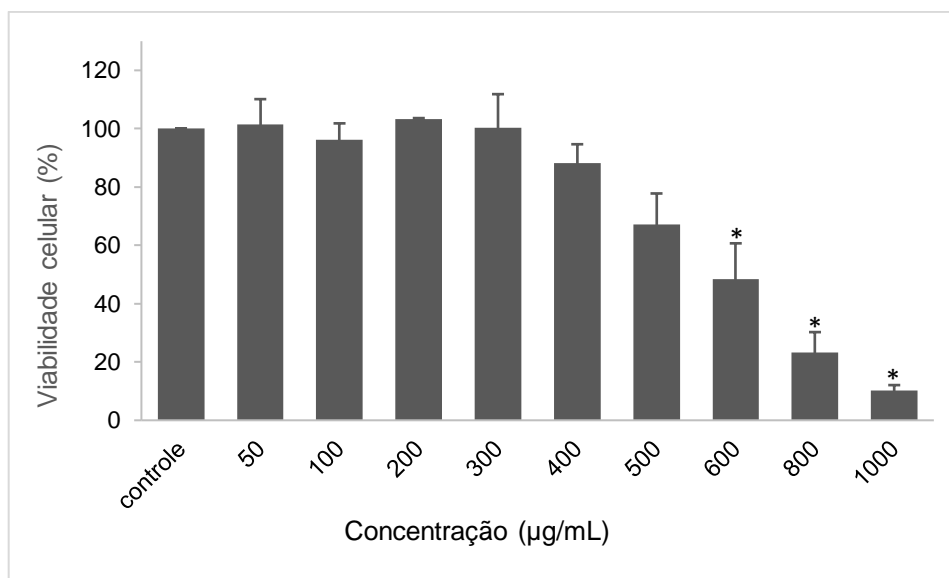


Figura 4 - Citotoxicidade do extrato de *M. nigra* em células RAW 264.7 na ausência de LPS. Dados representam média de três experimentos realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,005$  em relação ao controle (células tratadas com o veículo) no teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

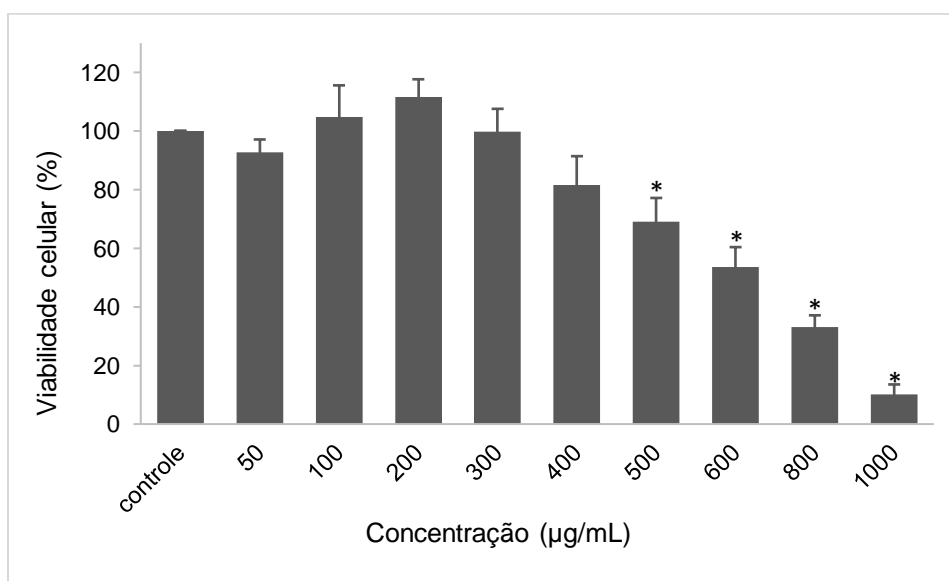


Figura 5 - Citotoxicidade do extrato de *M. nigra* em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. Dados representam média de três experimentos realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,005$  em relação ao controle (células tratadas com o veículo) no teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

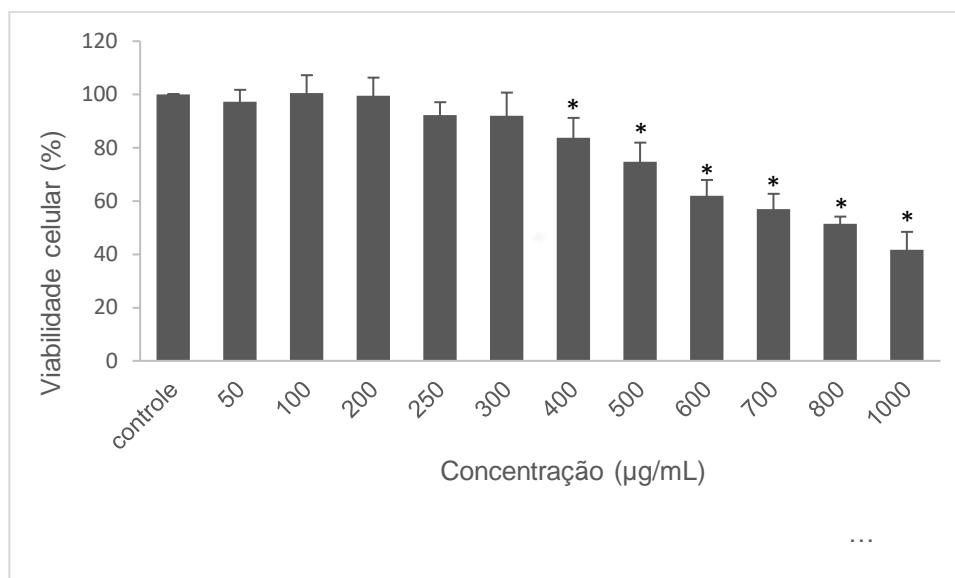


Figura 6 - Citotoxicidade do extrato de *M. nigra* em células HeLa. Dados representam média de três experimentos realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,005$  em relação ao controle (células tratadas com o veículo) no teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

## 5.5 ATIVAÇÃO DE RECEPTORES NUCLEARES - ENSAIO GENE REPÓRTER

No ensaio do gene repórter, plasmídeos contendo a sequência do DNA que codifica o gene do receptor de interesse e o gene repórter (luciferase) são inseridos no núcleo das células através de lipossomos. Quando substâncias agonistas ligam-se ao receptor nuclear, a maquinaria transcricional é ativada e, conseqüentemente, há a transcrição do gene repórter, luciferase. Ao adicionar o substrato da enzima luciferase, a luciferina, ocorre uma reação enzimática com emissão de luz, sendo a luz emitida proporcional à ativação do receptor.

### 5.5.1 Avaliação da ativação dos receptores PPAR

O extrato das folhas de *M. nigra* apresentou efeito agonista em relação ao receptor nuclear PPAR- $\gamma$  (Figura 7). A ativação do receptor pelo extrato foi comparada com a ativação pelo controle positivo, a rosiglitazona, que é um medicamento da classe dos antidiabéticos, agonista total do PPAR- $\gamma$ . O extrato das folhas de *M. nigra* na concentração de 200, 300 e 400  $\mu\text{g/mL}$  foi tão efetivo quanto a rosiglitazona, não apresentando diferença significativa ( $p > 0,005$ ) na ativação do receptor PPAR- $\gamma$ .

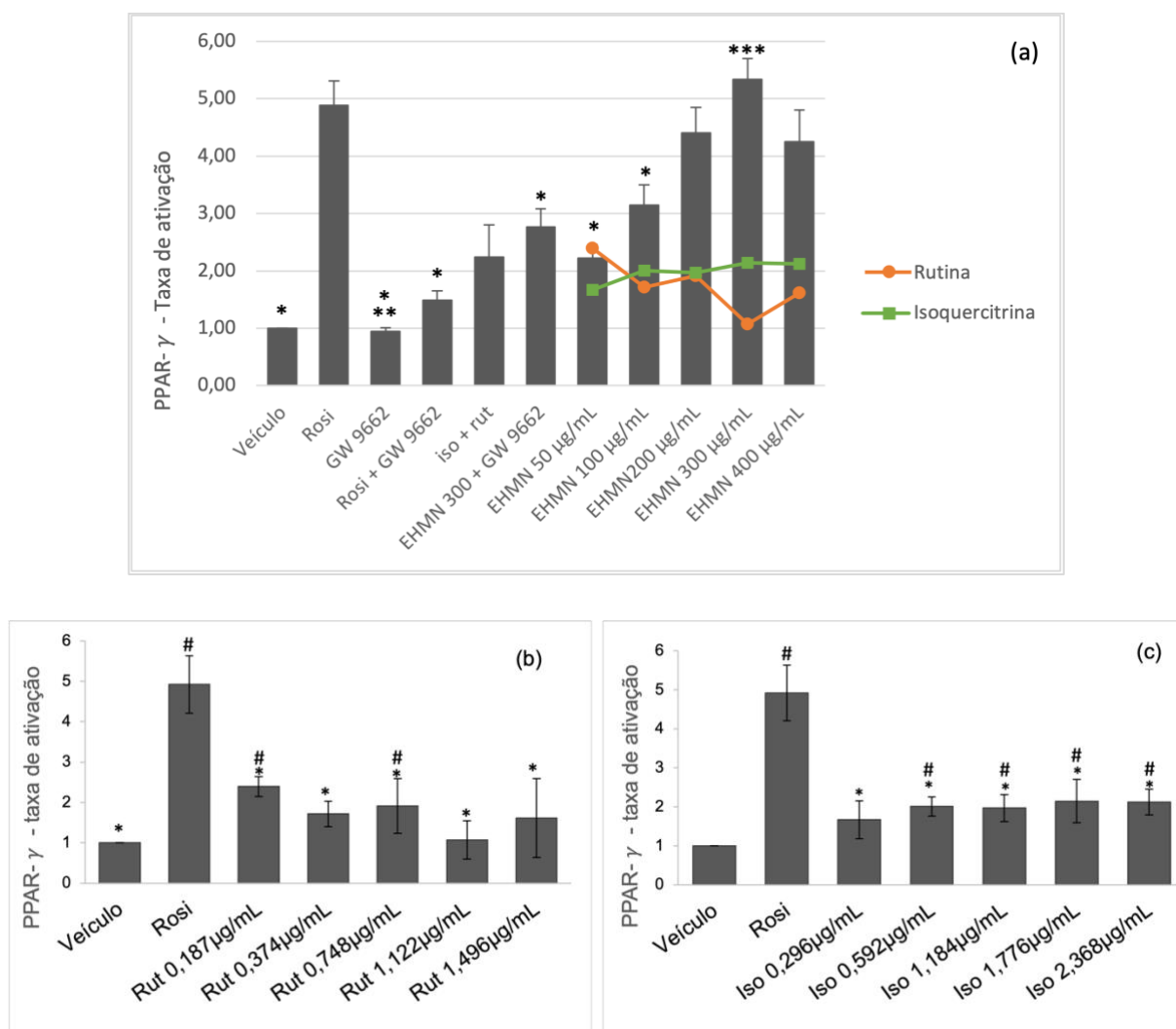


Figura 7 – Ativação do PPAR- $\gamma$  avaliado pelo ensaio do gene repórter. Rosi: Rosiglitazona  $10^{-5}$ M (agonista total PPAR- $\gamma$ ); GW 9662  $10^{-5}$ M (antagonista de PPAR- $\gamma$ ). Iso + Rut: Isoquercitrina 1,77  $\mu$ g/mL e rutina 1,12  $\mu$ g/mL; EHMN: Extrato hidroetanólico de *Morus nigra*. (a) Ativação de PPAR- $\gamma$  pelo EHMN comparado com a ativação pela rutina ou isoquercitrina. As substâncias rutina (b) e isoquercitrina (c) foram testadas separadamente nas concentrações correspondentes à sua presença no extrato (rutina: 0,187; 0,374; 0,748; 1,122 ou 1,496  $\mu$ g/mL; Isoquercitrina: 0,296; 0,592; 1,184; 1,776 ou 2,368  $\mu$ g/mL.). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Tukey. \* $p < 0,001$  em relação à Rosi. \*\*  $p < 0,001$  em relação à Rosi, EHMN 300 + GW 9662, EHMN 50, 100, 200, 300 e 400 $\mu$ g/mL e iso + rut. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao EHMN 300 + GW 9662, iso + rut, veículo, GW 9662, EHMN 50 e 100  $\mu$ g/mL. #  $p < 0,05$  em relação ao veículo.

Como o funcionamento do PPAR é dependente da formação do heterodímero com o receptor RXR, também foi investigado a inibição da atividade transcricional ao realizar o tratamento simultâneo com o extrato e o antagonista específico de PPAR.

Assim, seria possível descartar a possibilidade da ativação ser ocasionada apenas pela interação do extrato com o receptor RXR.

Apesar de ter ocorrido a ativação do receptor PPAR- $\gamma$  após o tratamento simultâneo com o extrato (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o antagonista GW 9662, houve uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) de 48% em relação ao tratamento exclusivo com o extrato na mesma concentração. Portanto, para obter o efeito máximo da atividade transcricional do receptor PPAR- $\gamma$ , a interação deste com o extrato é essencial.

Adicionalmente, as substâncias isoquercitrina e rutina foram testadas isoladamente, nas concentrações correspondentes à sua presença no extrato, para avaliar os seus papéis na ativação do receptor PPAR- $\gamma$ . A rutina ativou o receptor apenas nas concentrações de 0,187 e 0,748  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,05$ ), correspondente às concentrações presentes nas doses de 50 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do extrato, respectivamente. Entretanto, a taxa de ativação permaneceu baixa mesmo com o aumento da concentração. Além disso, a concentração de 0,748  $\mu\text{g}/\text{mL}$  levou a uma taxa de ativação 56% inferior à dose correspondente do extrato.

Em relação à isoquercitrina, a taxa de ativação do receptor PPAR- $\gamma$  permaneceu linear mesmo com o aumento da concentração e foi inferior ( $p < 0,0001$ ) a ativação causada pelas doses correspondentes do extrato. Quando testadas juntas, a rutina e isoquercitrina, resultaram em uma taxa de ativação 58% menor do que a do extrato bruto ( $p < 0,0001$ ).

A ativação do PPAR- $\alpha$  pelo extrato foi comparado com a ativação pelo agonista total, WY 14642. O extrato foi capaz de ativar o receptor de maneira dose-dependente. Além disso, na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , o extrato foi tão efetivo quanto o WY 14642 ( $p = 0,9739$ ), e nas concentrações de 200, 300 e 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , obteve taxa de ativação maior ( $p < 0,002$ ). As substâncias isoquercitrina e rutina, testadas separadamente ou juntas, não ativaram o receptor PPAR- $\alpha$  ( $p > 0,05$ ).

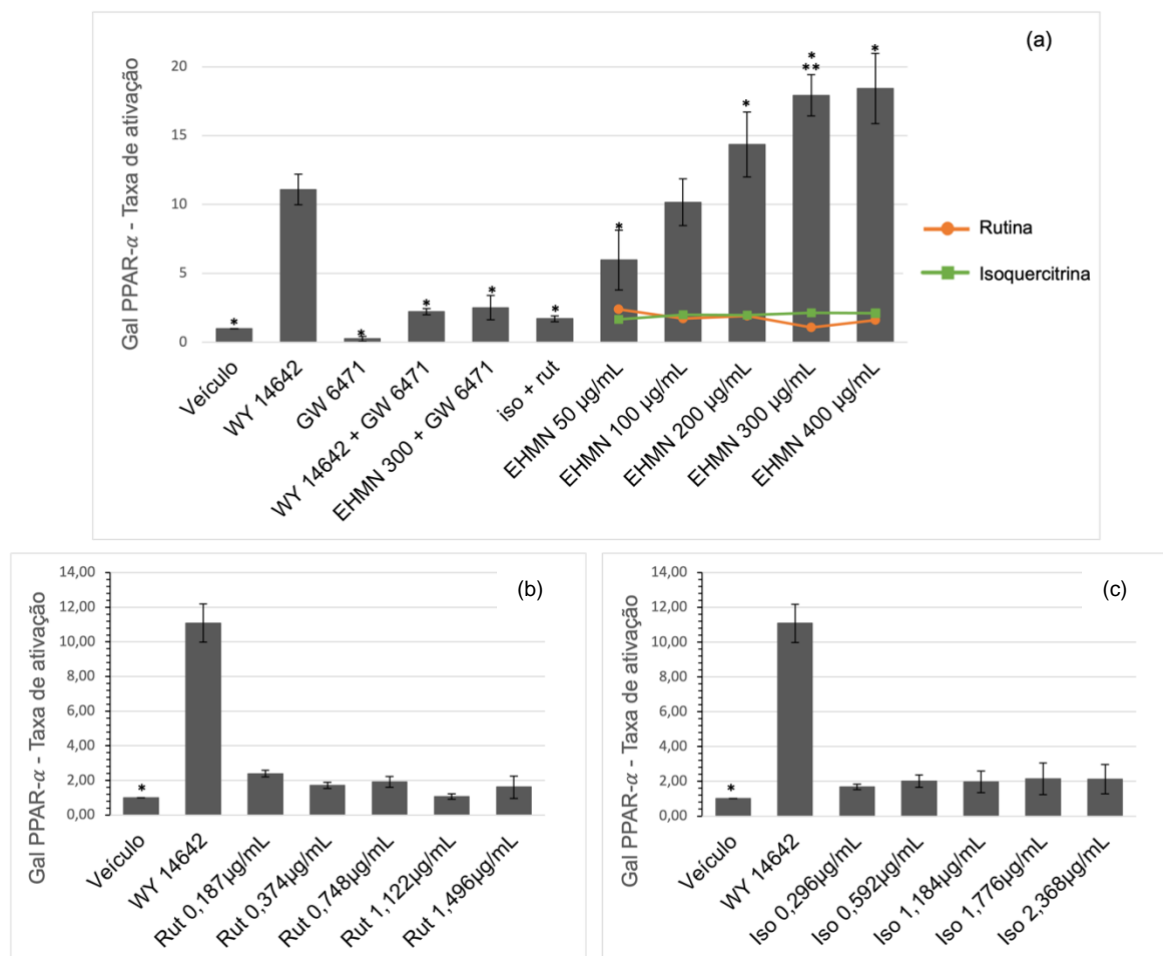


Figura 8 – Ativação do PPAR- $\alpha$  avaliado pelo ensaio gene repórter da luciferase. WY 14642:  $10^{-5}$ M (agonista de PPAR- $\alpha$ ); GW 6471  $10^{-4}$ M (antagonista de PPAR- $\alpha$ ). Iso + Rut: Isoquercitrina 1,77  $\mu$ g/mL e rutina 1,12  $\mu$ g/mL; EHMN: extrato hidroetanólico de *Morus nigra*. (a): Ativação de PPAR- $\alpha$  pelo EHMN comparado à ativação pela rutina ou isoquercitrina. As substâncias rutina (b) e isoquercitrina (c) foram testadas separadamente nas concentrações correspondentes à sua presença no extrato (rutina: 0,187; 0,374; 0,748; 1,122 ou 1,496  $\mu$ g/mL; Isoquercitrina: 0,296; 0,592; 1,184; 1,776 ou 2,368  $\mu$ g/mL.). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo pós teste Tukey's. \* $p < 0,0001$  em relação ao WY 14642. \*\*  $p < 0,0001$  em relação ao WY 14642, iso + rut e EHMN 300 + GW 6471.

Enquanto o tratamento simultâneo com o extrato (300  $\mu$ g/mL) e o antagonista de PPAR- $\alpha$ , GW 6471, reduziu o efeito do extrato em 86%, não apresentando diferença ( $p > 0,99$ ) em relação ao tratamento simultâneo do agonista (WY 14642) com o antagonista (GW 6471). Desta forma, o efeito do EHMN parece depender exclusivamente da sua interação com o receptor PPAR- $\alpha$ , e não com o RXR.

Em relação ao papel dos compostos majoritários, rutina e isoquercitrina, na ativação dos receptores PPAR, a taxa de ativação superior do extrato, comparado às



substâncias isoladas, pode ser resultante do efeito sinérgico entre seus compostos, demonstrando, neste caso, a vantagem da utilização do extrato bruto. Embora a tendência das pesquisas com plantas medicinais tenha focado principalmente na purificação e isolamento de novos compostos, o estudo de extratos brutos ainda é de grande relevância na saúde pública (155). Inclusive, a sua utilização é recomendada pelo Ministério da Saúde e pela OMS, principalmente, na prevenção e manejo de doenças crônicas associadas ao estilo de vida(102,103).

A ação do PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$  decorrente da ativação pelo extrato de *M. nigra* pode ser um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios observados neste estudo, uma vez que eles possuem a habilidade de inibir a atividade transcricional de genes inflamatórios resultando na diminuição de citocinas e estresse oxidativo (156,157). No entanto, há a necessidade da realização de mais testes que comprovem a ligação entre este mecanismo de ação com os resultados obtidos.

Considerando o papel dos receptores PPAR no metabolismo de lipídeos e de glicose, e seus efeitos anti-inflamatórios, agonistas duplos de PPAR- $\alpha/\gamma$  podem ser benéficos especialmente no tratamento de doenças crônicas exacerbadas pelo processo inflamatório. Como por exemplo, a diabetes tipo II e as síndromes metabólicas, que apresentam características que envolvem tanto a resistência insulínica quanto as dislipidemias. Além disso, estas substâncias parecem maximizar os efeitos benéficos e reduzir os efeitos adversos causados pela ativação do PPAR- $\gamma$  (158,159).

Até o momento, o saroglitazar é o único agonista duplo de PPAR- $\alpha/\gamma$  em fase de estudo mais avançado. Os estudos indicam que ele é capaz de melhorar o perfil lipídico e reduzir a pressão sanguínea, a aterosclerose e a inflamação. Outros medicamentos da mesma classe tiveram seus estudos descontinuados por causa dos efeitos adversos, que incluíam anemia, leucopenia, problemas renais e o desenvolvimento de tumores (160). Portanto, a descoberta de outros agonistas duplos que não causem efeitos adversos significativos ainda é de grande interesse para o desenvolvimento da medicina.

Este foi o primeiro trabalho a demonstrar o extrato das folhas de *M. nigra* como agonista dos receptores PPAR- $\alpha/\gamma$ . Em outro estudo, flavonoides isoprenilados

isolados do extrato hidroetanólico dos galhos de *M. nigra* foram testados apenas para o PPAR- $\gamma$ . Quatro (sangganol F, nigrasin K e outros dois não conhecidos), dos dez compostos testados, apresentaram atividade agonista de PPAR- $\gamma$ , no entanto a atividade foi menor do que a atividade da rosiglitazona (161).

### 5.5.2 Avaliação da ativação do receptor TR $\beta$

Por apresentar um bolso de ligação maior do que a maioria dos receptores nucleares, uma grande variedade de compostos pode se ligar ao receptor PPAR- $\gamma$ , sem que apresentem especificidade por este receptor. Assim, a ação do extrato de *M. nigra*, também foi avaliada em relação à ativação do receptor do hormônio tireoidiano (TR $\beta$ ), que apresenta um bolso de ligação menor.

A ativação do receptor TR $\beta$  pelo extrato foi comparada com ativação pelo hormônio triiodotironina (T<sub>3</sub>), agonista específico do receptor TR $\beta$ . Enquanto o T<sub>3</sub> obteve taxa de ativação média de 262,97, o extrato apresentou taxa de ativação entre 3,88 e 5,77 sem relação com a dose. Apesar de ter ativado o receptor, a baixa taxa de ativação do extrato, nas concentrações testadas, não apresentou diferença estatística entre o tratamento com o veículo ( $p > 0,05$ ).

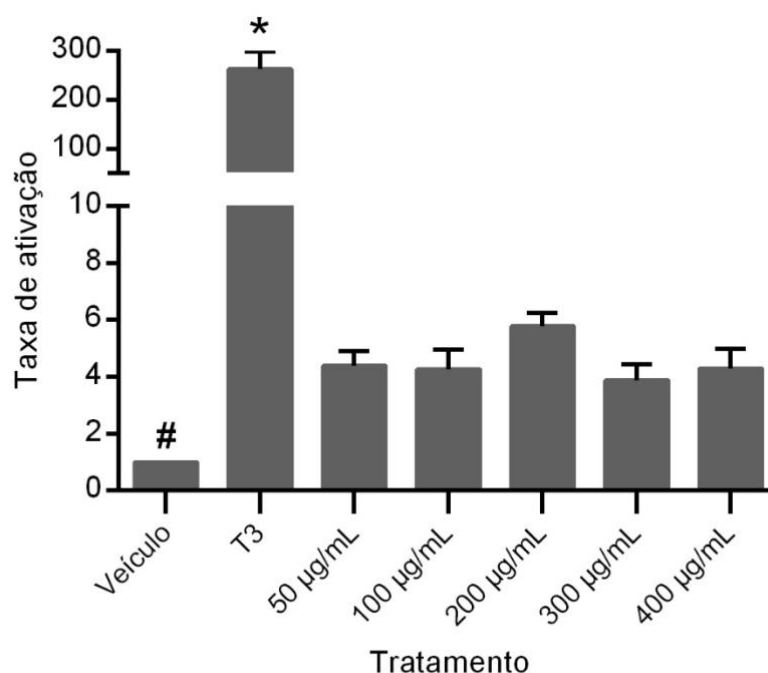


Figura 9 - Ativação do receptor TR $\beta$  pelo extrato de *M. nigra*. Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata  $\pm$  desvio padrão. \* e #:  $p < 0,001$  em relação aos demais no teste ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

Como não houve ativação do receptor TR $\beta$  relevante do ponto de vista estatístico quando comparado com o agonista T $_3$ , podemos dizer que o extrato de *M. nigra* foi seletivo para o receptor PPAR- $\gamma$ . Não foi encontrado nenhum outro estudo que avaliou a ação do extrato desta planta no receptor TR $\beta$ .

## 5.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO

Para avaliar a ação anti-inflamatória do extrato das folhas de *M. nigra*, os ensaios foram conduzidos em células de macrófago murino (RAW 264.7) estimuladas com LPS, que é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias gram-negativas e é um forte desencadeador da resposta inflamatória. Seu reconhecimento pelos receptores TLR desencadeia um caminho de sinalização que resulta na ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF- $\kappa$ B (162). Apesar de ser associado à inflamação aguda com maior frequência, o LPS também desempenha um papel importante na manutenção das doenças inflamatórias crônicas (163).

Atualmente, a maioria dos modelos de estudo de atividade anti-inflamatória, tanto *in vitro* como *in vivo*, utiliza o LPS como indutor. Em comparação com a utilização da própria bactéria como indutora, o LPS possui maior facilidade de preparo, maior garantia da quantidade aplicada e menor risco de contaminação (164).

### 5.6.1 Redução da produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio

A avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi realizada pelo método do reagente 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Ao atravessar a membrana celular, este reagente é hidrolisado resultando em um composto não fluorescente (DCFH). A oxidação do DCFH devido a presença de ERO, gera um composto altamente fluorescente (DCF). Assim, a fluorescência emitida é diretamente proporcional à concentração de ERO (139). Para minimizar a ocorrência de resultados falsos em decorrência da diferença do número de células, os dados de porcentagem de ERO foram normalizados pela quantidade de proteína.

O extrato das folhas de *M. nigra* nas concentrações de 200, 300 e 400 µg/mL reduziu 25, 39 e 53 %, respectivamente, a produção de ERO nas células estimuladas com LPS em relação às células não tratadas. As doses de 50 e 100 µg/mL, apesar de apresentarem redução (3 e 16%, respectivamente) não foi significativo quando analisado pelo teste estatístico ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey.

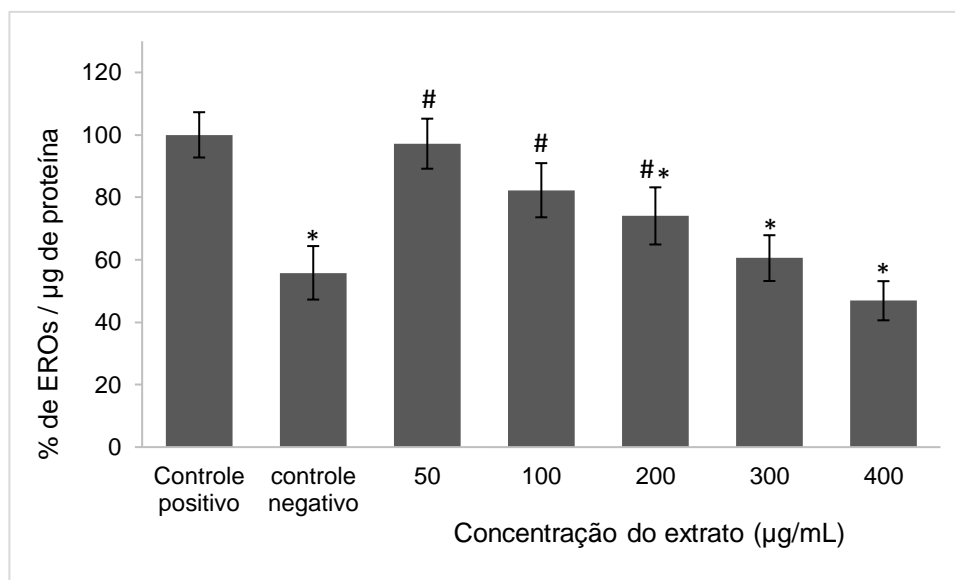


Figura 10 - Inibição da produção de Espécies Reativas de Oxigênio. Inibição da produção de EROs em células RAW 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com o extrato de *M. nigra*. Controle positivo: células estimuladas com LPS e tratadas com veículo. Controle negativo: células não estimuladas com LPS e tratadas com veículo. Dados representam média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,001$  em relação ao controle positivo; #  $p < 0,001$  em relação ao controle negativo.

Estes resultados demonstram o potencial antioxidante do extrato das folhas de *M. nigra*, sendo o primeiro estudo a avaliar esta atividade por meio do método da DCF em células estimuladas com LPS. A atividade antioxidante das folhas de *M. nigra* já foi evidenciada em outros estudos por diferentes métodos e em diversas situações: *in vitro* pela captação do radical DPPH e ABTS, e *in vivo* pela avaliação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e pela recuperação dos níveis de glutathiona reduzida (118–120,127,129).

Um agente antioxidante possui a capacidade de retardar ou prevenir a oxidação de substratos, minimizando os danos aos tecidos e órgãos, ocasionados em diversos processos patológicos. Como a inflamação está relacionada ao estresse oxidativo, uma vez que, mutuamente, um pode induzir o outro, um extrato com capacidade antioxidante pode ser útil no tratamento de doenças inflamatórias (165–167).

A atividade antioxidante do extrato pode ser atribuída a presença dos flavonoides rutina e isoquercitrina, visto que é uma função bem estabelecida na literatura para estas duas substâncias (168).

### 5.6.2 Redução da produção de óxido nítrico

A expressão de iNOS e, conseqüentemente, o aumento da produção de ON, é um dos resultados da ativação dos macrófagos pelo LPS. Uma baixa quantidade de óxido nítrico é importante para a eliminação de patógenos durante a resposta inflamatória, porém, a produção exacerbada pode contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias (169,170).

Como exemplo, a liberação sistêmica de ON inibe a migração de neutrófilos para o local da infecção, dificultando a remoção de bactérias e facilitando a ocorrência de sepse. Na artrite, o ON contribui com o dano articular e a degradação da massa óssea (170). Além disso, os níveis altos de ON podem causar dano ao DNA, proliferação celular e angiogênese, sendo frequentemente associado a tumores com prognósticos ruins (171). Assim, a diminuição de ON é um efeito farmacologicamente interessante para novos medicamentos anti-inflamatórios.

Para evitar falsos resultados de diminuição do óxido nítrico ocasionado pela morte celular, neste ensaio foram escolhidas apenas concentrações que apresentaram viabilidade celular superior a 80% no teste do MTT com as células RAW 264.7 estimuladas com LPS.

O estímulo da inflamação com LPS foi efetivo em aumentar a produção de óxido nítrico nas células. Após o tratamento com o extrato, nas concentrações de 75 a 200 µg/mL, a produção de ON foi reduzida significativamente ( $p < 0,04$  em relação às células estimuladas com LPS e não tratadas) em 28 a 63%, indicando o potencial do EHMN como anti-inflamatório.

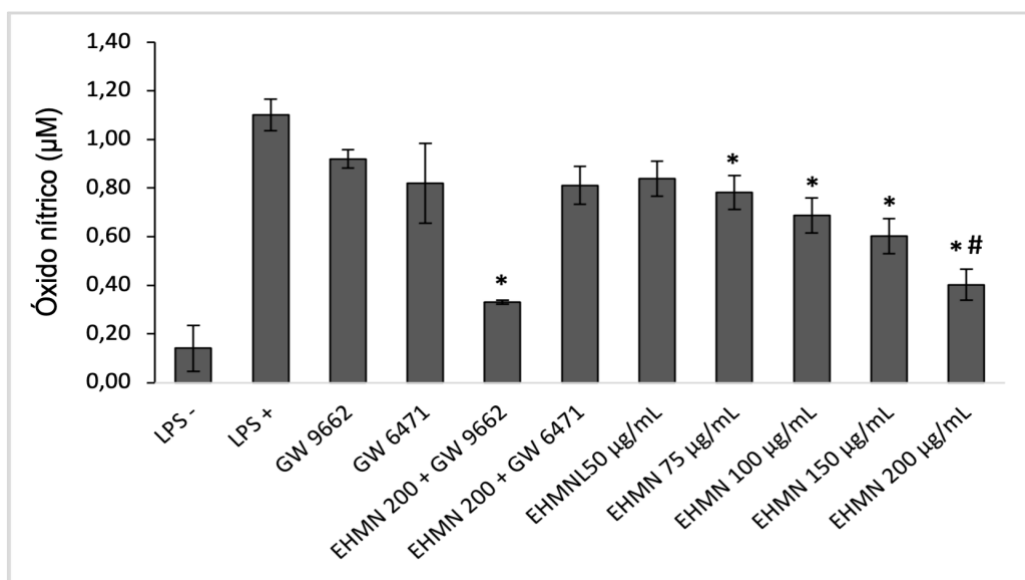


Figura 11 - Redução da produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas com Lipolisacarídeo de *Escherichia coli* 1 µg/mL, avaliada pelo método de Griess. LPS+: células estimuladas com LPS e tratadas com veículo. LPS -: células não estimuladas com LPS e tratadas com o veículo. EHMN: Extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra*. Dados representam média ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \* $p < 0.039$  em relação ao LPS +; #  $p = 0.002$  em relação ao EHMN 200 + GW 6471.

Em outro estudo, o extrato aquoso das folhas de *M. nigra* foi avaliado em relação a capacidade de inibir a produção de ON no soro ou cérebro de camundongos tratados por 1 ou 7 dias nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg. Apesar de não apresentar diferenças no tratamento agudo (1 dia), após o tratamento subcrônico (7 dias) o extrato apresentou redução do ON de 29 a 41 % no soro e de 15 a 27 % no cérebro, (120).

O antagonista de PPAR- $\alpha$ , GW 6471, foi capaz de bloquear o efeito do extrato na concentração de 200 µg/mL, não ocorrendo a redução da produção de ON. Assim, sugere-se a necessidade da ativação do PPAR- $\alpha$  para a obtenção do seu efeito. Por outro lado, o mesmo não foi observado após o tratamento simultâneo do extrato com o antagonista de PPAR- $\gamma$ , GW 9662, que não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento apenas com o extrato ( $p = 0,9995$ ).

### 5.6.3 Redução da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$

O estímulo com LPS também foi efetivo em aumentar a produção de TNF- $\alpha$ . O tratamento com o EHMN nas concentrações de 50 a 400  $\mu\text{g/mL}$  reduziu de forma significativa ( $p < 0,0231$ ), em 25 a 68%, a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , reafirmando a capacidade anti-inflamatória do extrato.

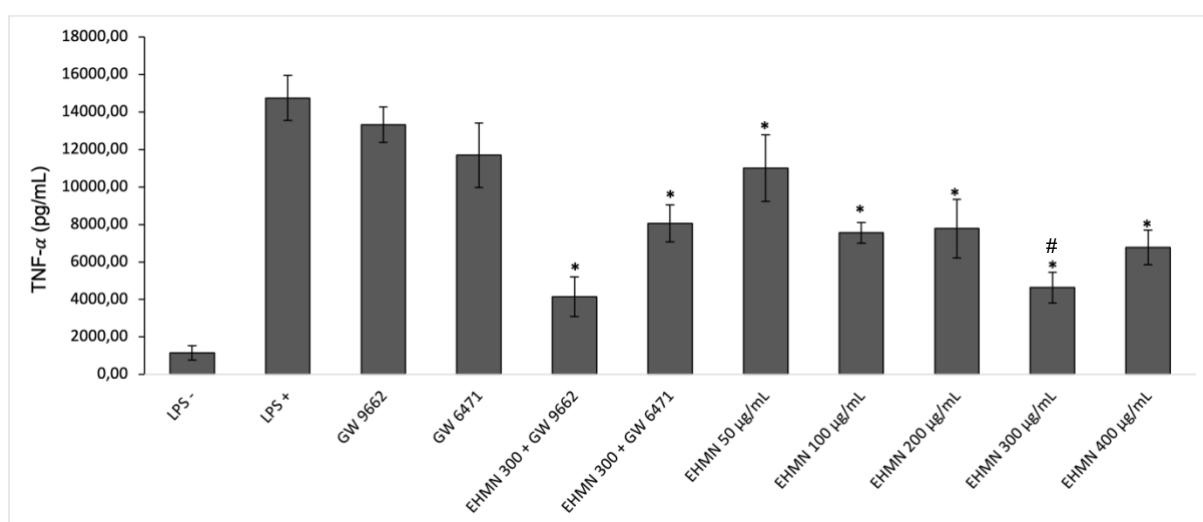


Figura 12 – Redução da produção do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em células RAW 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. LPS+: células estimuladas com LPS e tratadas com o veículo. LPS -: células não estimuladas com LPS e tratadas com veículo. EHMN: extrato hidroetanólico de *Morus nigra*. Dados representam média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. \* $p < 0,023$  em relação ao LPS +; #  $p = 0,047$  em relação ao EHMN 300 + GW 6471.

Após o tratamento concomitante com o extrato e o antagonista de PPAR- $\alpha$ , GW 6471, houve uma redução de TNF- $\alpha$ , porém, foi inferior à redução causada pelo tratamento apenas com o extrato ( $p = 0,0469$ ). Portanto, a ativação do receptor PPAR- $\alpha$  parece ser necessária para que o extrato possa atingir seu efeito máximo. Por outro lado, o tratamento simultâneo com o EHMN e o antagonista de PPAR- $\gamma$ , GW 9662, não apresentou diferença em relação ao tratamento apenas com o extrato ( $p > 0,999$ ).

Em comparação, um estudo que avaliou a nuciferina, um alcaloide natural, que também apresentou dupla atividade agonista para os receptores PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$ , observou a redução de 32% da produção de TNF- $\alpha$  em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, inferior ao observado no presente estudo (172).



Outro estudo, realizado em camundongos com sepse induzida por LPS, também observaram uma maior taxa de sobrevivência e uma redução significativa na produção de TNF- $\alpha$  no grupo tratado com o extrato das folhas de *M. nigra* (134) reafirmando o potencial anti-inflamatório das folhas desta espécie.

## 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Esse foi o primeiro estudo a demonstrar o efeito agonista do extrato das folhas de *M. nigra* para os subtipos de PPAR,  $\alpha$  e  $\gamma$ . Tendo em vista que os compostos majoritários, rutina e isoquercitrina, testados separadamente, não foram capazes de ativar significativamente os receptores, o efeito pode ser atribuído a outra substância não identificada ou ao sinergismo dos compostos. Sendo assim, necessita-se da realização de melhor caracterização do extrato e testagem de outros compostos isolados.

Adicionalmente, o extrato apresentou uma boa atividade anti-inflamatória, reduzindo significativamente a produção de EROs, NO e TNF- $\alpha$  em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. Enquanto o antagonista específico de PPAR- $\alpha$ , o composto GW 6471, foi capaz de bloquear parcialmente o efeito do extrato, demonstrando a necessidade da ativação do receptor PPAR- $\alpha$  para obtenção dos efeitos anti-inflamatórios do EHMN.

Assim, a ação dos PPARs, resultante da ativação pelo EHMN, pode ser um dos mecanismos responsáveis pela diminuição do estresse oxidativo e das citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, considerando que os PPARs atuam na inflamação por diversas vias, há a necessidade de uma melhor elucidação do mecanismo de ação da atividade anti-inflamatória das folhas de *Morus nigra*.

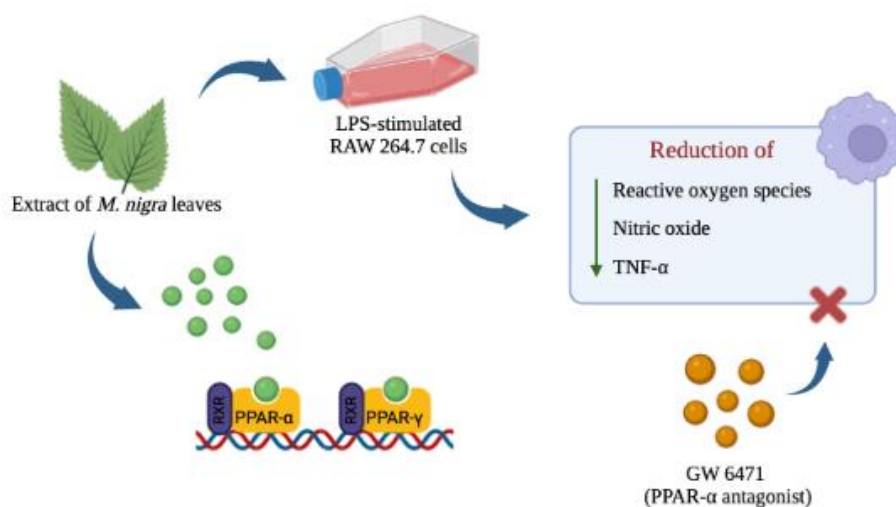


Figura 13 – Resumo gráfico. O extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra* apresentou atividade agonista para os receptores PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$ , e reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e TNF- $\alpha$  em células RAW 264.7 com inflamação induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Enquanto o antagonista de PPAR- $\alpha$ , GW 6471, bloqueou parcialmente ou totalmente o efeito do extrato.

Quadro 4 - Quadro-resumo dos resultados obtidos

<b>Método</b>	<b>Resultados</b>
CLAE	Presença de rutina (3,74 µg/mL) e isoquercitrina (5,92 µg/mL).
MTT HeLa	Baixa citotoxicidade. IC 50 de 562,23 µg/mL.
MTT RAW 264.7	Baixa citotoxicidade. IC 50 de 597,1 µg/mL.
Gene-repórter: PPAR-γ	EHMN obteve taxa de ativação comparável à rosiglitazona. Os compostos isolados, rutina e isoquercitrina, ocasionaram taxa de ativação inferior.
Gene-repórter: PPAR-α	EHMN obteve taxa de ativação superior ao WY 14642. Os compostos isolados, rutina e isoquercitrina, não ativaram o receptor.
Gene-repórter: TRβ	Não ocorreu ativação relevante quando comparado com o agonista T <sub>3</sub> .
EROs	Redução de 25 a 53% em relação as células não tratadas.
Óxido nítrico	Redução de 28 a 63% em relação às células não tratadas. Antagonista do PPAR-α bloqueou o efeito do EHMN.
TNF-α	Redução de 25 a 68% em relação às células não tratadas. Antagonista do PPAR-α bloqueou parcialmente o efeito do EHMN.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
2. Halim M, Halim A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.040>
3. Flynn MG, Markofski MM, Carrillo AE. Elevated Inflammatory Status and Increased Risk of Chronic Disease in Chronological Aging: Inflamm-aging or Inflamm-inactivity? *Aging Dis* [Internet]. 2019;10(1):147. Available from: <http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2018.0326>
4. Recio MC, Andújar I, Ríos JL. Anti-Inflammatory Agents from Plants : Progress and Potential. *Curr Med Chem*. 2012;19:2088–103.
5. Aung ET. Diabetic ketoacidosis in a patient with type 2 diabetes precipitated by infection , steroids and SGLT2 inhibitor. *Practical diabetes*. 2019;36(2):69–71.
6. Grossman A, Messerli FH, Grossman E. Drug induced hypertension – An unappreciated cause of secondary hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2015;763:15–22.
7. Xi L, Falco P De, Barbieri E, Karunaratne A, Bentley L, Esapa CT, et al. Bone matrix development in steroid-induced osteoporosis is associated with a consistently reduced fibrillar stiffness linked to altered bone mineral quality. *Acta Biomater*. 2018;76:295–307.
8. Huang SP, Wen YC, Huang ST, Lin CW, Wang TD. Nonsteroidal Anti-Inflammatory drugs and risk of first hospitalization for heart failure in patients with no history of heart failure: a population-based case-crossover study. *Drug Saf*. 2019;42(1):67–75.
9. Arias LHM, Gonzalez AM, Fradique RS, Vazquez ES. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Classical and Selective

- Cyclooxygenase-2 Inhibitors : A Meta-analysis of Observational Studies. *The journal of clinical Pharmacology*. 2019;59(1):55–73.
10. Pai AB, Divine H, Marciniak M, Morreale A, Saseen JJ, Say K, et al. Need for a Judicious Use of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs to Avoid Community-Acquired Acute Kidney Injury New Initiatives Are Needed to. *Annals of Pharmacotherapy*. 2019;53(1):95–100.
  11. Shin SJ, Noh C kyun, Lim SG, Lee KM, Lee KJ. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *Intest Res*. 2017;15(4):446–55.
  12. Bjarnason I, Scarpignato C, Holmgren E, Olszewski M, Rainsford KD, Lanas A. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology*. 2018;154:500–14.
  13. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2011;1812(8):1007–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>
  14. Martin H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res*. 2010;690:57–63.
  15. Miranda MA, Vieira GDV, Yamamoto CH, Pinho J de JRG, Sousa OV. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L . no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. *Hu rev* [Internet]. 2010 [cited 2022 Aug 24];36(1):61–8. Available from: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/817>
  16. Pio IDSL, Lavor AL, Damasceno CMD, Menezes PMN, Silva FS, Maia GLA. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco river , Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* ( Lamiaceae ). *Brazilian Journal of Biology*. 2019;79(1):87–99.
  17. Tng DYP, Apgaua DMG, Lisboa MDS, El-Hani CN. Plants uses in a traditional fisherman community in northeastern Brazil. *bioRxiv*. 2019;

18. Hamza N, Berke B, Umar A, Cheze C, Gin H. A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2019;111841.
19. Koncic MZ, Bljaji K. Traditional Herbal Products Used for the Management of Diabetes in Croatia : Linking Traditional Use With  $\alpha$  -Glucosidase-Inhibitory Activity. In: *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes.* Academic Press; 2019. p. 647–64.
20. de Freitas MM, Fontes PR, Souza PM, Fagg CW, Guerra ENS, de Medeiros Nóbrega YK, et al. Extracts of *Morus nigra* L Leaves Standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *PLoS One.* 2016;11(9):1–24.
21. Hago S, Mahrous EA, Moawad M, Abdel-wahab S, Abdel-sattar E. Evaluation of antidiabetic activity of *Morus nigra* L . and *Bauhinia variegata* L . leaves as Egyptian remedies used for the treatment of diabetes. *Nat Prod Res.* 2019;0(0):1–7.
22. Ribeiro AEAS, Soares JMD, Silva HAL, Wanderley CW de S, Moura CA, Oliveira-Júnior RG, et al. Inhibitory effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) against local paw edema and mechanical hypernociception induced by *Bothrops jararacussu* snake venom in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;111(2019):1046–56.
23. Lim H, Heo MY, Kim HP. Flavonoids: Broad Spectrum Agents on Chronic Inflammation. *Biomol Ther (Seoul)* [Internet]. 2019 May 1;27(3):241–53. Available from: <http://www.biomolther.org/journal/DOIx.php?id=10.4062/biomolther.2019.034>
24. Serino A, Salazar G. Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation , Aging and Cardiovascular Disease. *Nutrients.* 2019;11:1–23.
25. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Inflamação e reparo. In: Elsevier, editor. *Robbins Patologia Básica.* 2013.
26. Cen X, Liu S, Cheng K. The role of toll-like receptor in inflammation and tumor immunity. *Front Pharmacol.* 2018;9(AUG):1–8.

27. Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:234–44.
28. Savio LEB, Mello P de A, da Silva CG, Coutinho-Silva R. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: Angel or demon? *Front Pharmacol.* 2018;9(FEB).
29. Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:234–44.
30. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity.* 2014;41(5):694–707.
31. Gómez-Moreno D, Adrover JM, Hidalgo A. Neutrophils as effectors of vascular inflammation. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(April):1–14.
32. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000.* 2013;63(1):149–64.
33. Headland SE, Norling L V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol.* 2015;27(3):149–60.
34. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol.* 2018;30(11):511–28.
35. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019 Dec 1;25(12):1822–32.
36. Hariharan R, Odjidja EN, Scott D, Shivappa N, Hébert JR, Hodge A, et al. The dietary inflammatory index, obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular risk factors and diseases. *Obesity Reviews.* 2022 Jan 27;23(1).
37. Divella R, Caldarola GG, Mazzocca A. Chronic Inflammation in Obesity and Cancer Cachexia. Vol. 11, *Journal of Clinical Medicine.* MDPI; 2022.
38. Murray CJL, Aravkin AY, Zheng P, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet.* 2020 Oct;396(10258):1223–49.



39. Zand H, Morshedzadeh N, Naghashian F. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. 2017;11:S307–9.
40. Libby P, Kobold S. Inflammation : a common contributor to cancer , aging , and cardiovascular diseases — expanding the concept of cardio-oncology. *Cardiovasc Res*. 2019;115:824–9.
41. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204–18.
42. Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* [Internet]. 2020 Oct;396(10258):1204–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620309259>
43. Schulman IG. Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2010;62(13):1307–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.002>
44. van den Oever IAM, Baniaamam M, Simsek S, Raterman HG, van Denderen JC, van Eijk IC, et al. The effect of anti-TNF treatment on body composition and insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2021 Feb 10;41(2):319–28.
45. Burska AN, Sakthiswary R, Sattar N. Effects of Tumour Necrosis Factor Antagonists on Insulin Sensitivity/Resistance in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Jun 25;10(6):e0128889.
46. Oppenheim JJ. Cytokines, Their Receptors and Signals. *The Autoimmune Diseases*. Elsevier Inc.; 2020. 275–289 p.
47. Lewis DE, Blutt SE. Organization of the Immune System. Fifth Edit. Vol. 1, *Clinical Immunology*. Elsevier Ltd; 2019. 19–38 p.

48. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(7):399–409.
49. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: Implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(12):720–7.
50. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: Regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):89–102.
51. Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986–1000.
52. Brunton LL, Knollmann BC. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman*. 13th ed. Artmed, editor. 2018.
53. Rendra E, Riabov V, Mossel DM, Sevastyanova T, Harmsen MC, Kzhyshkowska J. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology*. 2019;224(2):242–53.
54. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016(Figure 1).
55. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol*. 2015;36(3):161–78.
56. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(4):471–9.
57. Papi S, Ahmadizar F, Hasanvand A. The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress. *Immunopathologia Persa*. 2019;5(1):e08–e08.
58. Nelson DL, Cox MM. *Principios de Bioquímica de Lehninger*. 6th ed. ARTMED, editor. Antropología ambiental. Porto Alegre; 2014.
59. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*. 2013.

60. Serasanambati M, Chilakapati SR. Function of Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) in Human Diseases-A Review. *South Indian Journal of Biological Sciences*. 2016;2(4):368.
61. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2(April).
62. Yamamoto Y, Gaynor R. Role of the NF- $\kappa$ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States. *Curr Mol Med*. 2005;1(3):287–96.
63. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2013;12(1):86. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-12-86>
64. Atsaves V, Leventaki V, Rassidakis GZ, Claret FX. AP-1 transcription factors as regulators of immune responses in cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7).
65. Rius-Pérez S, Pérez S, Martí-Andrés P, Monsalve M, Sastre J. Nuclear Factor Kappa B Signaling Complexes in Acute Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2020;1–64.
66. Rius-Pérez S, Pérez S, Martí-Andrés P, Monsalve M, Sastre J. Nuclear Factor Kappa B Signaling Complexes in Acute Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2020;1–64.
67. Ji Z, He L, Regev A, Struhl K. Regulatory network controlling tumor-promoting inflammation in human cancers. *bioRxiv*. 2018;60611.
68. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017 Apr;17(4):233–47.
69. Strehl C, Ehlers L, Gaber T, Buttgereit F. Glucocorticoids-All-Rounders Tackling the Versatile Players of the Immune System. *Front Immunol*. 2019;10(July):1744.
70. Luís M, Freitas J, Costa F, Buttgereit F, Boers M, JAP DS, et al. An updated review of glucocorticoid-related adverse events in patients with rheumatoid arthritis. *Expert Opin Drug Saf*. 2019;18(7):581–90.

71. Patel GC, Millar JC, Clark AF. Glucocorticoid receptor transactivation is required for glucocorticoid-induced ocular hypertension and glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(6):1967–78.
72. Moore N. Coronary Risks Associated with Diclofenac and Other NSAIDs: An Update. *Drug Saf.* 2020;(0123456789).
73. Blanca-Lopez N, Soriano V, Garcia-martin E, Canto G, Miguel Blanca. NSAID-induced reactions: classification, prevalence, impact, and management strategies. *J Asthma Allergy.* 2019;12:217–33.
74. Divya M, Nivetha SR, Mohan L, Arul B, Kothai R. Drug-induced renal disorder-a mini review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences.* 2020;11(1):166–72.
75. Gronemeyer H, Gustafsson J åke, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews.* 2004;3(November):950–64.
76. Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(3):1–4.
77. Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* 2003;116(4):585–6.
78. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53.
79. Tyagi S, Gupta P, Saini A, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research.* 2011.
80. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004;10(4):355–61.
81. Nissen SE, Wolski K. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *New England Journal of Medicine.* 2007 Jun 14;356(24):2457–71.

82. Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone Revisited. *Arch Intern Med.* 2010 Jun 28;170(14).
83. Davidson MA, Mattison DR, Azoulay L, Krewski D. Thiazolidinedione drugs in the treatment of type 2 diabetes mellitus: past, present and future. *Crit Rev Toxicol.* 2018 Jan 2;48(1):52–108.
84. Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem.* 2019;166:502–13.
85. Narala VR, Ranga R, Smith MR, Berlin AA, Standiford TJ, Lukacs NW, et al. Pioglitazone is as effective as dexamethasone in a cockroach allergen-induced murine model of asthma. *Respir Res.* 2007;
86. Kadam L, Kilburn B, Baczyk D, Kohan-Ghadr HR, Kingdom J, Drewlo S. Rosiglitazone blocks first trimester in-vitro placental injury caused by NF- $\kappa$ B-mediated inflammation. *Sci Rep.* 2019;
87. Hevener AL, Olefsky JM, Reichart D, Nguyen MTA, Bandyopadhyay G, Leung HY, et al. Macrophage PPAR $\gamma$  is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *Journal of Clinical Investigation.* 2007;117(6):1658–69.
88. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006;444(7121):840–6.
89. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Miglio G, Tomasinelli C, Boccuzzi G, et al. Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. *Br J Pharmacol.* 2010;160(8):1892–902.
90. Kong Y, Gao Y, Lan D, Zhang Y, Zhan R, Liu M, et al. Trans-repression of NF $\kappa$ B pathway mediated by PPAR $\gamma$  improves vascular endothelium insulin resistance. *J Cell Mol Med.* 2019;23(1):216–26.

91. Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):365–76.
92. Todisco S, Santarsiero A, Convertini P, de Stefano G, Gilio M, Iacobazzi V, et al. PPAR Alpha as a Metabolic Modulator of the Liver: Role in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Biology (Basel)*. 2022 May 23;11(5):792.
93. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, et al. Molecular Actions of PPAR $\alpha$  in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev*. 2018 Oct 1;39(5):760–802.
94. Karczewski J, Śledzińska E, Baturó A, Jończyk I, Maleszko A, Maleszko A, et al. Obesity and inflammation. *Eur Cytokine Netw*. 2018 Sep;29(3):83–94.
95. Zhou H, Urso CJ, Jadeja V. Saturated Fatty Acids in Obesity-Associated Inflammation. *J Inflamm Res*. 2020 Jan;Volume 13:1–14.
96. Rana MN, Neeland IJ. Adipose Tissue Inflammation and Cardiovascular Disease: An Update. *Curr Diab Rep*. 2022 Jan 18;22(1):27–37.
97. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR $\alpha$ –leukotriene B<sub>4</sub> pathway to inflammation control. *Nature*. 1996 Nov;384(6604):39–43.
98. Grabacka M, Pierzchalska M, Płonka PM, Pierzchalski P. The Role of PPAR Alpha in the Modulation of Innate Immunity. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 29;22(19):10545.
99. Staels B, Maes M, Zambon A. Fibrates and future PPAR $\alpha$  agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008 Sep 15;5(9):542–53.
100. Zhou J, Li D, Cheng Q. Fenofibrate monotherapy-induced rhabdomyolysis in a patient with post-pancreatitis diabetes mellitus. *Medicine*. 2020 May 22;99(21):e20390.

101. Alsheikh-Ali AA, Kuvin JT, Karas RH. Risk of adverse events with fibrates\*. *Am J Cardiol.* 2004 Oct;94(7):935–8.
102. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 [Internet]. World Health Organization. 2013. p. 1–78. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/92455>
103. World Health Organization (WHO). WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. Geneva; 2019.
104. Ahmad Khan MS, Ahmad I. Herbal Medicine. In: *New Look to Phytomedicine* [Internet]. Elsevier; 2019. p. 3–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012814619400001X>
105. Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia - Do produto Natural ao medicamento*. 1st ed. Artmed, editor. Porto Alegre; 2017. 486 p.
106. Shakya AK. Medicinal plants: Future source of new drugs. *Int J Herb Med.* 2016;4(4):59–64.
107. Zeng Q, Chen H, Zhang C, Han M, Li T, Qi X, et al. Definition of Eight Mulberry Species in the Genus *Morus* by Internal Transcribed Spacer- Based Phylogeny. *PLoS One.* 2015;1–13.
108. Missouri Botanical Garden. *Morus nigra* L. Tropicos.org [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 13]. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/21300470>
109. Dhiman S, Kumar V, Mehta CM, Gat Y, Kaur S. Bioactive compounds , health benefits and utilisation of *Morus* spp .– a comprehensive review. *J Hortic Sci Biotechnol.* 2019;00(00):1–11.
110. Negro C, Aprile A, Bellis L De, Miceli A. Nutraceutical Properties of Mulberries Grown in Southern Italy (Apulia). *Antioxidants.* 2019;8.
111. Samami R, Seidavi A, Eila N, Moarre M, Ziaja DJ, Lis JA, et al. Production performance and economic traits of silkworms (*Bombyx mori* L ., 1758) fed with mulberry tree leaves (*Morus alba* , var . Ichinose) significantly differ according to hybrid lines. *Livest Sci.* 2019;226(June):133–7.

112. Brasil. Ministério da Saúde. RENISUS - Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. 2009.
113. Padilha MM, Moreira LQ, Morais FF, Araújo TH, Morus L. Artigo Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010;20(4):621–6.
114. Cavuldak ÖA, Ertan R, Vural N, Akay MA. Optimization of ultrasound-assisted water extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from black mulberry leaves ( *Morus nigra* L .). *J Food Process Eng*. 2019;(April):1–15.
115. Schafranski K, Postigo MP, Vitali L, Micke GA, Richter WE. Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) utilizando planejamento experimental. *Quim Nova*. 2019;42(7):736–44.
116. Sánchez-Salcedo EM, Mena P, García-Viguera C, Hernández F, Martínez JJ. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *J Funct Foods*. 2015;
117. Figueredo KC, Guex CG, Reginato FZ, Haas AR, Cassanego GB, Lima C, et al. Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats. *J Ethnopharmacol*. 2018;224:290–6.
118. Zeni ANALB, Moreira TD, Dalmagro ANAP, Camargo A, Bini LA, Simionatto E, et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(4):2805–15.
119. Turgut NH, Mert DG, Kara H, Egilmez HR, Arslanbas E, Tepe B, et al. Effect of black mulberry ( *Morus nigra* ) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d-galactose-induced aging mice. *Pharm Biol*. 2016;54(6):1052–64.
120. Dalmagro AP, Camargo A, Lúcia A, Zeni B. *Morus nigra* and its major phenolic , syringic acid , have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. *Metab Brain Dis*. 2017;32(6):1963–73.



121. Iqbal S, Younas U, Sirajuddin, Chan kim wei, Sarfraz RA, Uddin K. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of Mulberry (*Morus* sp.): A Comparative Study. *International Journal of Molecular Science*. 2012;13(6):6651–64.
122. Umair M, Altaf M, Bussmann RW, Abbasi AM. Ethnomedicinal uses of the local flora in Chenab riverine area , Punjab province Pakistan. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2019;15(7).
123. Carvalho D de S. Preservação dos saberes tradicionais de plantas medicinais no assentamento São Francisco, Canutama, Amazonas. Universidade Federal do Amazonas; 2019.
124. Vendruscolo GS, Mentz LA. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa , Porto Alegre , Rio Grande do Sul ,. *Iheringia Série Botânica*. 2006;61(1/2):83–103.
125. Caetano NLB, Ferreira TF, Reis MRO, Neo GGA, Carvalho AA. Plantas medicinais utilizadas pela população do município de Lagarto- SE , Brasil – ênfase em pacientes oncológicos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2015;17(4):748–56.
126. Ferrão BH, Oliveira HB, Fátima R, Teixeira MB, Fontes GG, Amaro FO, et al. Importância do conhecimento tradicional no uso de plantas medicinais em Buritis , MG , Brasil. *Ciência e Natura*. 2014;36:321–34.
127. Eruygur N, Dural E. Determination of 1-Deoxynojirimycin by a developed and validated HPLC-FLD method and assessment of In-vitro antioxidant,  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity in mulberry varieties from Turkey. *Phytomedicine*. 2019;53:234–42.
128. Araujo CM, Lúcio KDP, Silva ME, Isoldi MC, De Souza GHB, Brandão GC, et al. *Morus nigra* leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. *Food Funct*. 2015;6(11):3490–9.
129. Montenote MC, Wajsman VZ, Konno YT, Ferreira PC, Silva RMG, Therezo ALS, et al. Antioxidant effect of *Morus nigra* on Chagas disease progression. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2017 Nov 6;59(0). Available from:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652017005000244&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000244&lng=en&tlng=en)

130. Abouzid SF, Ahmed OM, Ahmed RR, Mahmoud A, Abdella E, Ashour MB. Antihyperglycemic effect of crude extracts of some Egyptian plants and algae. *J Med Food*. 2014;17(3):400–6.
131. Júnior IIDS, Barbosa HDM, Carvalho DCR, Barros RDA, Albuquerque FP, Da Silva DiHA, et al. Brazilian *Morus nigra* Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Scientific World Journal*. 2017;
132. Ren X, Sun Y, Guo Q, Liu H, Jiang H, He X, et al. Ameliorating Effect of the Total Flavonoids of *Morus nigra* L. on Prediabetic Mice Based on Regulation of Inflammation and Insulin Sensitization. *J Agric Food Chem*. 2022 Oct 5;70(39):12484–501.
133. Tag HM. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15(1):1–9.
134. Lúcio KDP, Carolina A, Rabelo S, Araújo CM, Brandão GC, Henrique G, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) in a Model of LPS-Induced Sepsis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
135. Costa JPL. Efeito do extrato de *Morus nigra* L. no tratamento de sintomas vasomotores em mulheres com síndrome climatérica - um estudo randomizado, placebo - controlado. Universidade Federal do Maranhão; 2018.
136. INMET. INMET [Internet]. 2017 [cited 2017 Nov 15]. Available from: <http://www.inmet.gov.br/sim/sonabra/dspDadosCodigo.php?ODMzNzc=>
137. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. *Diário Oficial da União*. 2014;

138. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
139. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(99):612–6.
140. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;(126):131–8.
141. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*. 2016;5.
142. Hou LS, Cui ZY, Sun P, Piao HQ, Han X, Song J, et al. Rutin mitigates hepatic fibrogenesis and inflammation through targeting TLR4 and P2X7 receptor signaling pathway in vitro and in vivo. *J Funct Foods [Internet]*. 2020;64(June 2019):103700. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103700>
143. Nikfarjam BA, Adineh M, Hajiali F, Nassiri-Asl M. Treatment with rutin - A therapeutic strategy for neutrophil-mediated inflammatory and autoimmune diseases: Anti-inflammatory effects of rutin on neutrophils. *J Pharmacopuncture*. 2017;20(1):52–6.
144. Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, Al-Shabanah OA, Alotaibi MR, As Sobeai HM, et al. Rutin inhibits carfilzomib-induced oxidative stress and inflammation via the NOS-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Inflammopharmacology [Internet]*. 2019;27(4):817–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0550-5>
145. Nkpaa KW, Onyeso GI. Rutin attenuates neurobehavioral deficits, oxidative stress, neuro-inflammation and apoptosis in fluoride treated rats. *Neurosci Lett [Internet]*. 2018;682:92–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.023>
146. Taşlı NG, Çimen FK, Karakurt Y, Uçak T, Mammadov R, Süleyman B, et al. Protective effects of rutin against methanol induced acute toxic optic neuropathy: An experimental study. *Int J Ophthalmol*. 2018;11(5):780–5.

147. Xie PS, Leung AY. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica. *J Chromatogr A*. 2009;1216(11):1933–40.
148. Huang SH, Xu M, Wu HM, Wan CX, Wang HB, Wu QQ, et al. Isoquercitrin Attenuated Cardiac Dysfunction Via AMPK $\alpha$ -Dependent Pathways in LPS-Treated Mice. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62(24):1–41.
149. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*. 2012;114(8):785–96.
150. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J Neurochem*. 1997;69(2):581–93.
151. Bruggisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med*. 2002;68(5):445–8.
152. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2005;45(2):108–11.
153. International Organization for Standardization. ISO, I. 10993–5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva; 2009.
154. Chen H, Yu W, Chen G, Meng S, Xiang Z, He N. Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black mulberries. *Molecules*. 2018;23(1):13–5.
155. Yuan H, Ma Q, Cui H, Liu G, Zhao X, Li W, et al. How Can Synergism of Traditional Medicines Benefit from Network Pharmacology? *Molecules*. 2017 Jul 7;22(7):1135.
156. Toyota Y, Nomura S, Makishima M, Hashimoto Y, Ishikawa M. Structure-activity relationships of rosiglitazone for peroxisome proliferator-activated receptor gamma transrepression. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(12):2776–80.

157. Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):365–76.
158. Cheng, Tan, Low, Marvalim, Lee, Tan. Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 11;20(20):5055.
159. Tan CK, Zhuang Y, Wahli W. Synthetic and natural Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) agonists as candidates for the therapy of the metabolic syndrome. Vol. 21, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 333–48.
160. Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori C, Mitro N, Ruscica M. PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 14;19(4):1197.
161. Xu LJ, Yu MH, Huang CY, Niu LX, Wang YF, Wu CZ, et al. Isoprenylated flavonoids from *Morus nigra* and their PPAR  $\gamma$  agonistic activities. *Fitoterapia*. 2018;127(January):109–14.
162. Seeley JJ, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol*. 2017;101(1):107–19.
163. Page MJ, Kell DB, Pretorius E. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress*. 2022 Jan 8;6:247054702210763.
164. Hoogland ICM, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):1–13.
165. Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:17–9.

166. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019(Ldl).
167. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(9):1121–32.
168. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
169. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*. 2020;40(1):158–89.
170. Spiller F, Oliveira Formiga R, Fernandes da Silva Coimbra J, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide*. 2019;89(November 2018):32–40.
171. Kashfi K, Vannini F. Nitric Oxide and Cancer: To Inhibit or To Induce iNOS: That Is the Question? Therapeutic Application of Nitric Oxide in Cancer and Inflammatory Disorders. Elsevier Inc.; 2019. 93–111 p.
172. Zhang C, Deng J, Liu D, Tuo X, Yu Y, Yang H, et al. Nuciferine Inhibits Proinflammatory Cytokines via the PPARs in LPS-Induced RAW264.7 Cells. *Molecules*. 2018 Oct 22;23(10):2723.