
CENTRO UNIVERSITÁRIO PADRE ALBINO
BIOMEDICINA

VINÍCIUS LOPES GUARDIA
ARIANE HARUMI YOSHIKAWA

***Morus nigra* em um modelo de hipertensão induzido por dexametasona**

Catanduva-SP
2022

CENTRO UNIVERSITÁRIO PADRE ALBINO
BIOMEDICINA

VINÍCIUS LOPES GUARDIA
ARIANE HARUMI YOSHIKAWA

***Morus nigra* em um modelo de hipertensão induzido por dexametasona**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de graduação em Biomedicina, apresentado ao Centro Universitário Padre Albino – UNIFIPA.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Girol

Catanduva-SP
2023

Ficha catalográfica
Centro Universitário Padre Albino - Biblioteca

G914m Guardia, Vinícius Lopes

Morus nigra em um modelo de hipertensão induzido por dexametasona / Vinícius Lopes Guardia, Ariane Harumi Yoshikawa — 2023.

17 f. : 30 cm.

Orientadora: Ana Paula Giroi

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Centro Universitário Padre Albino, Curso de Biomedicina, 2023.

1. Goiaba. 2. Compostos ativos. 3. Extratos de plantas medicinais 4. Antioxidantes. - TCC. I. Yoshikawa, Ariane Harumi. II. Giroi, Ana Paula. III. Centro Universitário Padre Albino, Curso de Biomedicina. IV. Título.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	03
2. MATERIAL E MÉTODO	04
2.1 Aspectos Éticos.....	04
2.2 Infraestrutura e Coleta de Dados	04
2.3 Métodos de obtenção do extrato	09
2.4 Avaliação da atividade antioxidante	05
2.5 Modelo de hipertensão	05
2.6 Avaliações de Creatinina e Ureia	06
2.7 Análises Histopatológicas	07
2.8 Análises estatísticas	07
3. RESULTADOS	08
3.1 Atividade antioxidante	08
3.2 Pressão sanguínea.....	08
3.3 Creatinina e ureia	08
3.4 Análises Histopatológicas	10
4. DISCUSSÃO	11
5. CONCLUSÃO	12
6REFERÊNCIAS.....	13

1 INTRODUÇÃO

Ao longo de milhares de anos, plantas são utilizadas para diversos fins medicinais/terapêuticos, sendo esta prática difundida entre os mais variados povos, como os indígenas, e passadas para as gerações futuras, principalmente através das pessoas mais velhas. Seu uso é destinado tanto para animais quanto para humanos, sendo um adjuvante ou alternativa medicamentosa bem aceita, principalmente devido à sua acessibilidade mais facilitada, quando comparadas à certos fármacos, principalmente os mais recentes, além da sua segurança e eficácia [1, 2, 3].

Dentre os diversos tipos de plantas utilizadas para essas finalidades, a amora preta (*Morus nigra* L.) é uma erva que possui diversas propriedades farmacológicas, principalmente em suas folhas e frutos. Esta espécie, pertencente à família Moraceae, é amplamente distribuída em regiões subtropicais da Ásia, como no Japão e China, América do Norte e África, sendo usadas, principalmente na maioria dos países europeus, na culinária, como em vinagres, sucos e vinhos, além de estar presentes em cosméticos [1, 2, 3].

Devido à sua composição química, ela demonstrou efeitos terapêuticos e protetores para alguns sistemas do corpo humano, como sistema nervoso central (SNC), gastrointestinal e reprodutor feminino, podendo também ser usada no combate à diabetes, como a diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. A maioria de suas características se devem ao fato dela possuir propriedades antioxidantes, devido sua composição fitoquímica abundante de certos compostos, como antocianinas, substância pertencente ao grupo dos flavonoides [1, 2, 3].

Neste trabalho foi avaliada a potencial ação cardioprotetora proveniente da redução da pressão arterial, pela administração da fração acetato de etila do extrato de folhas de *M. nigra*, como alternativa para o tratamento contra esta doença crônica [3, 4, 5].

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Aspectos Éticos

Os procedimentos de cunho experimentais foram executados na Unidade de Pesquisa Experimental (UDPE-UNIFIPA) e efetuados de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA-UNIFIPA), conforme a aprovação N° 09/21.

2.2 Infraestrutura e Coleta de Dados

Os procedimentos foram realizados No Centro de Pesquisas Experimentais e Clínicas (CEPEC-UNIFIPA) Catanduva, SP.

2.3 Métodos de obtenção do extrato

As folhas de *Morus nigra L.* foram adquiridas no Horto do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), localizado em Catanduva – SP, no dia 13 de março de 2023, no período da manhã. A árvore apresentava alguns frutos e brotos de folhas, tendo sua exsicata depositada no herbário Irina Delanova Gemtchujnicov-Botu (no. de registro 34713).

O extrato bruto (EB) foi obtido por meio da técnica de percolação, através do uso de 20 gramas (g) das folhas trituradas, associadas com 100 mililitros (ml) de álcool de cereais. Lembrando que, antes de trituradas, as mesmas foram lavadas (com água e detergente) e secas naturalmente.

Após a extração do conteúdo líquido-sólido, o álcool foi extraído com a utilização do aparelho rotaevaporador, com temperatura ajustada para 40° C. Posterior a esses processos, o EB obtido foi associado na proporção 1:1 com o solvente acetato de etila (AE). Após 24 horas em ambiente privado de luz, foi extraída a parte orgânica e, posteriormente, a mistura foi reeluída em 1 ml de água destilada, gerando assim a fração AE.

2.4 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato (AE) foi mensurada pela capacidade de sequestro de radicais livres, com o uso da substância química 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Onde, na presença de um composto antioxidante, a coloração púrpura do DPPH decai/reduz, permitindo assim sua leitura/análise através do aparelho “espectrofotômetro”.

Após a adição da solução de DPPH, as amostras foram mantidas ao abrigo da luz (ambiente escuro) durante 30 minutos, para posterior leitura/análise em espectrofotômetro ajustado em 520 nanômetros (nm).

A atividade antioxidante foi expressada como o percentual de inibição do radical DPPH (AA%) e em “termos de CE50” (concentração mínima necessária para que o antioxidante consiga reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH). As determinações foram realizadas em triplicatas.

2.5 Modelo de hipertensão

Ratos da linhagem Wistar, fêmeas, com seis semanas de idade, foram obtidos na Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE-UNIFIPA). Os animais foram divididos em três grupos (n=5/grupo), sendo eles: “Grupo Controle” (que não desenvolveu hipertensão), “Grupo Induzido” (que desenvolveu hipertensão, induzida por Dexametasona, porém não recebeu o tratamento fitoterápico) e Grupo Tratado (que desenvolveu hipertensão, também induzida por Dexametasona, e recebeu o tratamento fitoterápico - fração acetato de etila).

Os animais foram mantidos em gaiolas que obtinham os requisitos higiênicos e estruturais recomendados, em ambiente com temperatura controlada (22 a 25 °C) e configurado para que as luzes do local mudem de “estado” (ligadas ou desligadas) a cada 12 horas (simulando a passagem do dia), além de terem água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram acompanhados pelo veterinário da instituição e conduzidos de acordo com as normas da CEUA-UNIFIPA.

O modelo proposto possui um período de duração de quinze dias, sendo dividido, para melhor compreensão, em quatro etapas, sendo elas:

Etapa anterior a indução: antes da indução da hipertensão por Dexametasona nos “Grupos Induzido e Tratado”, a pressão de todos os grupos foi aferida através da cauda, de forma não invasiva e registrada. Após isso, todos os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas. Todos esses processos serão feitos no “dia 0” do modelo proposto.

Etapa de indução: com início no “dia 1”, os ratos dos “Grupos Induzido e Tratado” receberam, através de aplicação subcutânea, 30 microlitros (μL) de Dexametasona por dia, durante quatorze dias. Após sete dias de indução/aplicação, foi realizada novamente a aferição de pressão, confirmando a obtenção de hipertensão por parte dos ratos, sendo os resultados registrados.

Etapa de tratamento: a partir do oitavo dia de indução/aplicação, os animais do “Grupo Tratado” iniciaram sua terapêutica com 1 ml de fração acetato de etila (AE), por gavagem. Vale lembrar que, mesmo sendo tratados, eles receberam a indução por Dexametasona até o “dia 14” do modelo proposto, assim como o “Grupo Induzido”.

Etapa final: no décimo-quarto dia deste modelo, os animais foram colocados novamente nas “gaiolas metabólicas” e a pressão de todos foram novamente aferidas e registradas. No último dia (“dia 15”), todos os ratos foram eutanasiados através de dose excessiva do anestésico inalatório isoflurano. Os rins foram coletados.

2.6 Avaliações de Creatinina e Ureia

Para dosagem urinária da creatinina, foi utilizado o kit “Labtest Creatinina” (Ref.: 35) com aprovação da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), com número de registro sendo 10009010034. Para dosagem urinária de ureia, foi utilizado o kit “Labtest Ureia CE” (Ref.: 27) com aprovação da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), com número de registro sendo 10009010011. Todos os procedimentos necessários foram feitos seguindo o protocolo proposto no manual do kit, incluindo seu método de leitura.

2.7 Análises Histopatológicas

Após a eutanásia os rins foram coletados, em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. Secções de 5µm foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para as análises histopatológicas.

2.8 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise descritiva e determinação da normalidade. Para distribuição normal foi usada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Todos os valores foram expressos como média ± S.E.M. (erro padrão da média). Admitiu-se nível de significância para valor $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

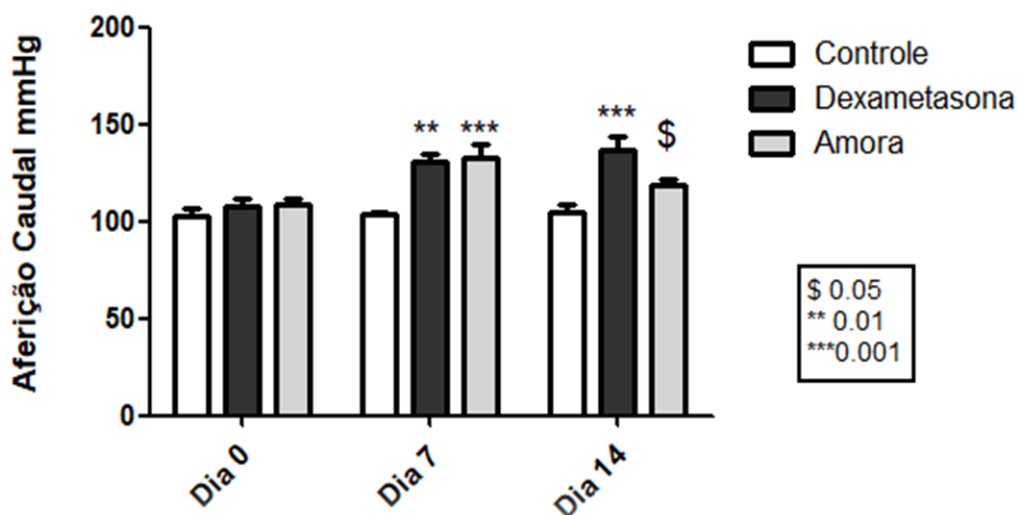
3.1 Atividade antioxidante

O resultado obtido pelo teste de atividade antioxidante DPPH foi de 73,56%.

3.2 Pressão sanguínea

Conforme ilustrado no gráfico da figura 1, as pressões caudais se mostraram equivalentes entre os grupo no “dia 0”, ficando as médias dos valores aproximadas em 100 mmHg; no “dia 7” foi observado aumento da pressão nos grupos que receberam a Dexametasona; no “dia 14” foi observado ainda o aumento na pressão sanguínea do “grupo induzido” e redução no “grupo tratado”.

Figura 1. Gráfico com as médias das pressões sanguíneas aferidas pela cauda (mmHg) obtidas pelos grupos ao decorrer do modelo proposto.

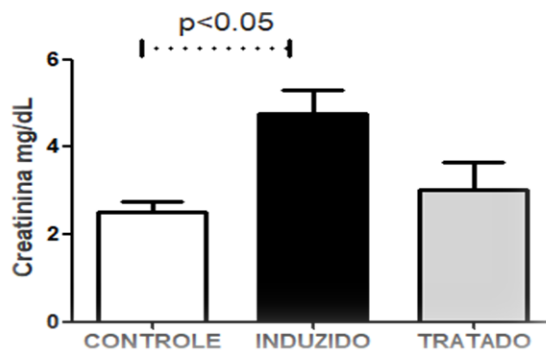


3.3 Creatinina e ureia

Conforme observado na figura 2, houve diferença entre as médias obtidas dos níveis de creatinina urinária entre os grupos; o “grupo controle” apresentou valor próximo de 2mg/dL; o “grupo induzido” teve um valor entre 6 e 4 mg/dL; o “grupo

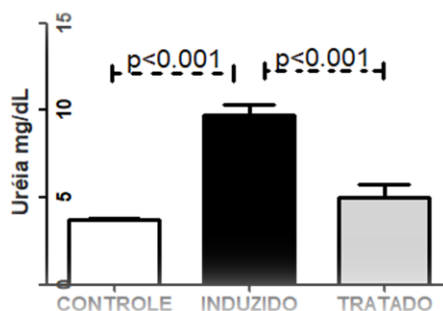
tratado” apresentou um valor abaixo de 4 mg/dL, evidenciando assim redução em relação ao “grupo induzido” e valores próximos ao “grupo controle”.

Figura 2. Gráfico com as médias dos valores de creatinina urinária (mg/dL) obtidas pelos grupos ao decorrer do modelo proposto.



Em relação as médias dos valores de ureia urinária obtidas entre os grupos ao decorrer do modelo, houve diferença entre os grupos, conforme evidenciado na figura 3. As concentrações em mg/dL dos grupos “controle” e “tratado” ficaram semelhantes (próximas a 5), enquanto que a concentração do “grupo induzido” ficou em torno de 10 mg/dL.

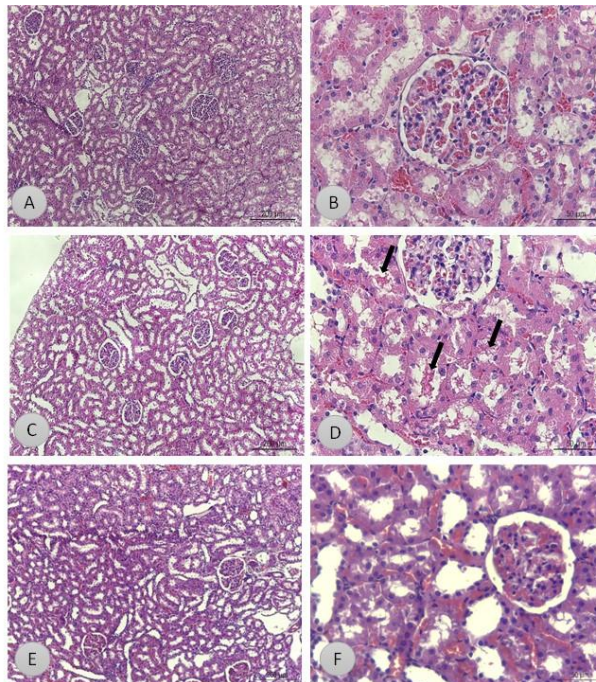
Figura 3. Gráfico com as médias dos valores de ureia urinária (mg/dL) obtidas pelos grupos ao decorrer do modelo proposto.



3.4 Análises Histopatológicas

As análises do histopatológicas mostraram arquitetura normal nos animais do controle. No córtex renal dos animais do “grupo induzido” foram observados mais cilindros hialinos, relacionados a proteínas plasmáticas filtradas nos glomérulos e condensadas na luz dos túbulos renais. O córtex renal dos animais tratados mostrou características semelhantes ao “grupo controle”.

Figura 3. Histologia do córtex renal. A e B) grupo controle com aspecto normal. C e D) grupo induzido, onde se observam vários cilindros hialinos (setas) no interior dos túbulos renais. E e F) grupo tratado com características semelhantes aos grupo controle.



4. DISCUSSÃO

O uso prolongado (crônico) do glicocorticoide dexametasona está associado com a diminuição da capacidade antioxidante do nosso corpo, devido a redução da quantidade de óxido nítrico (NO), importante vasodilatador, bem como, a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS), vasoconstritoras, provocando a hipertensão arterial [6, 7, 8].

O NO é um radical livre inorgânico produzido pelas células endoteliais, por exemplo, e age nas células musculares lisas vasculares através de uma cascata de reações químicas, acarretando na diminuição da concentração de cálcio intracelular, diminuindo o tônus vascular e gerando um vasorrelaxamento [7, 9, 10].

Com relação às ROS, esse grupo de diferentes moléculas atua em vários processos bioquímicos no nosso corpo, onde, dentre suas diversas ações, elimina o NO oriundo do endotélio, devido a redução da eNOS endotelial, responsável pela produção do NO, promovendo, portanto, reduzindo sua biodisponibilidade, o que limita a capacidade vasodilatadora do organismo [7, 11, 12, 13].

Conforme evidenciado pelos resultados obtidos nas análises da pressão sanguínea, o tratamento foi capaz de reduzi-la, muito possivelmente pela sua capacidade de captura de radicais livres, como as ROS, possibilitando com que o NO exerça seu papel vasodilatador e antioxidante.

Um fator que pode corroborar com o uso terapêutico das folhas da espécie *Morus nigra* e com os resultados obtidos é a alta capacidade antioxidante do extrato, relacionada a constituição fitoquímica, provavelmente composta por flavonoides, como as antocianinas, capazes de regular a pressão sanguínea. Além disso, investigações demonstram que as antocianinas apresentam capacidade de inibir e eliminar ROS e reduzir a pressão sanguínea [14, 15, 16, 17].

Outro aspecto que deve ser considerado/analísado neste cenário é a possibilidade do surgimento/desenvolvimento de patologias renais, sendo esta provocada pela hipertensão e ROS, visto que ambas estão relacionadas com a deterioração/disfunção renal [18, 19].

Portanto, foram realizadas medições dos níveis de creatinina e ureia, pois como essas são substâncias majoritariamente excretadas pela urina, pois problemas renais

podem influenciar nesse processo e causar alterações em suas concentrações, como o aumento em casos de hiperfiltração glomerular [20, 21, 22, 23].

Conforme sinalizado pelos resultados da creatinina e ureia, o aumento significativo em suas concentrações na urina pode ser uma evidência de que os animais estavam apresentando algum tipo de patologia renal. Porém, as reduções de suas concentrações nas amostras do “grupo tratado” indicam que o extrato foi capaz de reduzir, possivelmente devido seu efeito antioxidante e hipotensor, a pressão sanguínea e os prováveis danos renais.

Finalmente, as análises histopatológicas corroboraram os resultados bioquímicos, pois, embora no curto período de experimentação, já foi possível observar a presença de cilindros hialinos nos animais do “grupo induzido”. Diferentemente, os animais do “grupo tratado” apresentaram características histológicas semelhantes aos animais controle.

5. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos apontam os efeitos benéficos do uso da fração acetato de etila das folhas de *M. nigra* em modelo de hipertensão, o que estimula novas investigações desse extrato como possibilidade de alternativa na terapêutica.

6 REFERÊNCIAS

1. Siddique Z, Ahmed HM, Hussein KN, Hassan KI, Meena BI. Herbal medicinal uses and their practices in human health care and livestock from district Haripur, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Vet Med Sci*. 2022 Nov;8(6):2683-2695. doi: 10.1002/vms3.948. Epub 2022 Sep 29. PMID: 36173733; PMCID: PMC9677399.
2. Rodrigues EL, Marcelino G, Silva GT, Figueiredo PS, Garcez WS, Corsino J, Guimarães RCA, Freitas KC. Nutraceutical and Medicinal Potential of the *Morus* Species in Metabolic Dysfunctions. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 14;20(2):301. doi: 10.3390/ijms20020301. PMID: 30646503; PMCID: PMC6358891.
3. Lim SH, Choi CI. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients*. 2019 Feb 20;11(2):437. doi: 10.3390/nu11020437. PMID: 30791521; PMCID: PMC6412198.
4. Maqsood M, Khan MI, Sharif MK, Faisal MN. Phytochemical characterization of *Morus nigra* fruit ultrasound-assisted ethanolic extract for its cardioprotective potential. *J Food Biochem*. 2022 Nov;46(11):e14335. doi: 10.1111/jfbc.14335. Epub 2022 Jul 18. PMID: 35848720.
5. Chaudhry MA, Alamgeer -, Mushtaq MN, Alqarni AO, Alyami BA, Mahnashi MH, Alqahtani YS, Akram M, Irfan HM, Riaz H, Qasim S. Endothelium independent calcium channel blocking pathways mediate antihypertensive effect of *morus nigra*. *Pak J Pharm Sci*. 2021 Mar;34(2(Supplementary)):781-785. PMID: 34275815.
6. Safaeian L, Zabolian H. Antioxidant effects of bovine lactoferrin on dexamethasone-induced hypertension in rat. *ISRN Pharmacol*. 2014 Jan 22;2014:943523. doi: 10.1155/2014/943523. PMID: 24587916; PMCID: PMC3920649.
7. Neves JA, Neves JA, Oliveira RCM. Biomarcadores de função endotelial em doenças cardiovasculares: hipertensão. *J Vasc Bras*. 2016 Jul-Sep;15(3):224-233. Portuguese. doi: 10.1590/1677-5449.000316. PMID: 29930594; PMCID: PMC5829760.
8. Nguелеfack-Mbuyo EP, Peyembouo FP, Fofié CK, Nguелеfack TB. Dose-dependent and time-dependent metabolic, hemodynamic, and redox disturbances in dexamethasone-treated Wistar rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2021 Apr 19;33(4):457-469. doi: 10.1515/jbcpp-2020-0365. PMID: 34704690.
9. Yu B, Ichinose F, Bloch DB, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 2019 Jan;176(2):246-255. doi: 10.1111/bph.14512. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30288739; PMCID: PMC6295404.
10. Tenopoulou M, Doulias PT. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Res*. 2020 Oct 1;9:F1000 Faculty Rev-1190. doi: 10.12688/f1000research.19998.1. PMID: 33042519; PMCID: PMC7531049.
11. Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat Rev Cancer*. 2022 May;22(5):280-297. doi: 10.1038/s41568-021-00435-0. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35102280.
12. Agita A, Alsagaff MT. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Acta Med Indones*. 2017 Apr;49(2):158-165. PMID: 28790231.
13. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Sep;20(9):689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1. Epub 2021 Jun 30. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Aug;20(8):652. PMID: 34194012; PMCID: PMC8243062.
14. Ghorbani A, Hooshmand S. Protective Effects of *Morus nigra* and Its Phytochemicals against Hepatotoxicity: A Review of Preclinical Studies. *Pharmacology*. 2021;106(5-6):233-243. doi: 10.1159/000515032. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33849010.

15. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013 Dec 29;2013:162750. doi: 10.1155/2013/162750. PMID: 24470791; PMCID: PMC3891543.
16. Wang J, Li H, Xia T, Feng J, Zhou R. Pulmonary arterial hypertension and flavonoids: A role in treatment. *Chin J Physiol*. 2021 May-Jun;64(3):115-124. doi: 10.4103/cjp.cjp_25_21. PMID: 34169916.
17. Hao J, Gao Y, Xue J, Yang Y, Yin J, Wu T, Zhang M. Phytochemicals, Pharmacological Effects and Molecular Mechanisms of Mulberry. *Foods*. 2022 Apr 18;11(8):1170. doi: 10.3390/foods11081170. PMID: 35454757; PMCID: PMC9028580.
18. De Bhailis ÁM, Kalra PA. Hypertension and the kidneys. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2022 May 2;83(5):1-11. doi: 10.12968/hmed.2021.0440. Epub 2022 May 27. PMID: 35653320.
19. Ho HJ, Shirakawa H. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Cells*. 2022 Dec 25;12(1):88. doi: 10.3390/cells12010088. PMID: 36611880; PMCID: PMC9818928.
20. Kashani K, Rosner MH, Ostermann M. Creatinine: From physiology to clinical application. *Eur J Intern Med*. 2020 Feb;72:9-14. doi: 10.1016/j.ejim.2019.10.025. Epub 2019 Nov 8. Erratum in: *Eur J Intern Med*. 2023 Oct;116:168-169. PMID: 31708357.
21. Mischak H, Delles C, Vlahou A, Vanholder R. Proteomic biomarkers in kidney disease: issues in development and implementation. *Nat Rev Nephrol*. 2015 Apr;11(4):221-32. doi: 10.1038/nrneph.2014.247. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25643662.
22. Wang H, Ran J, Jiang T. Urea. *Subcell Biochem*. 2014;73:7-29. doi: 10.1007/978-94-017-9343-8_2. PMID: 25298336.
23. Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B, Schrier RW. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Feb 21;8(5):293-300. doi: 10.1038/nrneph.2012.19. PMID: 22349487.