



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARÍLIA KALINNE DA SILVA TORRES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PREPARAÇÕES OBTIDAS DE SEMENTES DE
Moringa oleifera E DA LECTINA WSMoL NAS VIAS INFLAMATÓRIAS E DE
SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM MODELOS DE SEPSE E OBESIDADE**

RECIFE
2021

MARÍLIA KALINNE DA SILVA TORRES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PREPARAÇÕES OBTIDAS DE SEMENTES DE
Moringa oleifera E DA LECTINA WSMoL NAS VIAS INFLAMATÓRIAS E DE
SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM MODELOS DE SEPSE E OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof^a. Dr.^a Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Bruno de Melo Carvalho (UPE).

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Torres, Marília Kalinne da Silva

Avaliação do efeito de preparações obtidas de sementes de *Moringa oleifera* e da lectina WSMoL nas vias inflamatórias e de sinalização da insulina em modelos de sepse e obesidade / Marília Kallinne da Silva Torres. - 2021.

174 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva.

Coorientador: Prof. Dr. Bruno de Melo Carvalho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. I. Plantas medicinais. 2. Lectinas. 3. Obesidade. I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orientadora). II. Carvalho, Bruno de Melo (coorientador). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-033-222

MARÍLIA KALINNE DA SILVA TORRES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PREPARAÇÕES OBTIDAS DE SEMENTES DE
Moringa oleifera E DA LECTINA WSM_oL NAS VIAS INFLAMATÓRIAS E DE
SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM MODELOS DE SEPSE E OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Dayane Aparecida Gomes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e por ter sempre me guiado nessa longa caminhada. Foi nele que me apoiei em vários momentos de desespero, solidão e cansaço. A ele só gratidão por ter chegado até aqui com saúde e sabedoria.

Aos meus pais, Neci e Wilson, por todo amor, apoio e consolo prestados ao longo da vida. A eles sou extremamente grata, pois apesar de todas as dificuldades, sempre me incentivaram na busca dos meus objetivos. Eles que, assim como eu, acreditam que a educação é capaz de transformar vidas. Amo vocês!

Ao meu irmão, avós, sobrinhos, tios e primos que sempre me aplaudiram por cada objetivo alcançado e foram fundamentais nos momentos de lazer e distração.

A Yasmim, um presente dos céus, agradeço por toda a amizade, atenção e companheirismo. Ela que sempre se fez presente em cada momento importante da minha vida. No laboratório me ajudou com as pesquisas experimentais e me estimulou a não desistir quando as coisas pareciam não funcionar. A ela também agradeço por todos os momentos vividos fora do ambiente acadêmico e a cada palavra de força e incentivo que sempre deixavam meus dias melhores.

À minha amiga/irmã Bárbara, que a graduação em Biomedicina me trouxe, por todo carinho, apoio e conselhos ao longo de todos esses anos. Obrigada por cada palavra de incentivo. Ela que também se fez presente em vários momentos importantes da minha vida. Sou grata por te ter como amiga!

Ao meu ex-namorado e eterno amigo, Jailton, por cada momento lindo vivido ao teu lado. Você que mergulhou de cabeça comigo nessa pesquisa. Que me incentivou e ajudou efetivamente em várias etapas, como me acompanhando tarde da noite ao laboratório para colocar os animais em jejum, ou realizando comigo os testes experimentais. A você que também me proporcionou inúmeros momentos de lazer e distração, minha eterna gratidão.

A todos os demais amigos biomédicos, Giwellington (Giw), Emanuelle (minha comadre), Milena, Hicla, Ivamberto, Rodrigo, Sabrina, Melyna, Sthephanie por toda a amizade e momentos vividos ao longo desses anos.

Aos amigos do Laboratório de Imunometabolismo Experimental (LIME) da UPE, minha eterna gratidão por toda amizade e conhecimento compartilhado ao longo desses anos. Em especial à Yasmim, Milena, Ana Maria, Ruy, Estéfani,

Amanda, Adauto, Jonathan, Patrícia, Fátima e Juliana, vocês me inspiram e contribuíram grandemente para meu crescimento acadêmico e pessoal.

À família BIOPROT da UFPE pelo acolhimento e apoio prestado, principalmente nas fases iniciais da minha pesquisa. No BIOPROT, tive a oportunidade de conhecer e conviver com inúmeras pessoas maravilhosas, como Robson, Poliana, Lívia, Bernardo, Dayvid, Maiara, Leydianne, Bruna, Matheus e tantos outros que me proporcionaram vários momentos de ensinamento e alegria. Como não amar o Arriá do BIOPROT e as festas de final de ano, sempre com muita animação e fartura. Meu muito obrigada a todos vocês.

Aos ICs, Vitória e Lucas, por ter me permitido ensinar e aprender com vocês.

A Cleyton pelo apoio, paciência e carinho.

À minha orientadora Patrícia Paiva por ter me aceito para orientação, mesmo sem me conhecer antes, e por ter me acolhido tão bem em seu laboratório, estando sempre acessível nos momentos de dificuldade. Uma orientadora que me inspira por sua dedicação e profissionalismo. Obrigada por todo ensinamento; foi uma honra lhe ter como orientadora.

Ao meu co-orientador Bruno Carvalho por todo ensinamento e apoio prestado na época do mestrado que foram fundamentais para o meu desenvolvimento ao longo do doutorado.

Ao professor Thiago Napoleão sempre tão prestativo, paciente e sempre pronto a ajudar. Muito obrigada por todo o apoio.

À professora Dayane e seus orientandos por toda contribuição em minha formação. Por toda paciência e acolhimento em seu laboratório.

Ao professor Luiz e Edson e aos seus alunos Jeferson e Alessandre pelo acolhimento no Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) da UFAL e por toda contribuição e ensinamentos.

A professora Sura pelos ensinamentos e acolhimento em seu laboratório.

À secretária Adenilda (Adê) do PPGCB por toda ajuda e paciência.

Ao professores que fazem parte do PPGCB por todo ensinamento concedido.

Ao apoio concedido pelo Departamento de Bioquímica e pelo CB e a todos os técnicos vinculados.

Ao ICB e ao Núcleo experimental da UPE pelo suporte técnico concedido.

À FACEPE pelo apoio financeiro e concessão de bolsa durante o doutorado.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis (José de Alencar).

RESUMO

A tese avaliou extrato aquoso (EXT), fração proteica (FR60) e a lectina WSMoL de sementes de *M. oleifera* quanto a atividade antibacteriana, efeito sobre o controle glicêmico e perfil inflamatório em camundongos sépticos e efeito sobre inflamação, sensibilidade à insulina, esteatose hepática e metabólitos fecais em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica. A atividade antibacteriana foi investigada através da determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB). A sepse foi induzida em camundongos Swiss pelo modelo xxxxxxxx e os animais foram tratados ou não com as preparações; a sobrevivência dos animais, glicemia de jejum, tolerância a Insulina (ITT) e citocinas inflamatórias foram avaliadas. Animais obesos tratados ou não com as preparações foram avaliados quanto a resistência à insulina, tolerância à glicose, citocinas inflamatórias, padrão histológico do tecido adiposo epididimal e do fígado, e metabólitos fecais. EXT, FR60 e WSMoL apresentaram CMI variando entre 0,03 e 1,10 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Escherichia coli*. Camundongos sépticos apresentaram hipoglicemia, resistência à insulina e aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias e os tratamentos com EXT e WSMoL não reverteram o quadro, enquanto FR60 normalizou os níveis glicêmicos, melhorou a sensibilidade à insulina e reduziu os níveis de citocinas TNF- α , IL-2 e IL-6. Camundongos obesos desenvolveram resistência à insulina, acúmulo de gordura hepática e inflamação crônica de baixo grau. O tratamento com FR60 melhorou a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina e todas as preparações reduziram TNF- α e INF- γ . Ainda, EXT e FR60 reduziram esteatose hepática, a hipertrofia dos adipócitos e infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo. EXT, FR60 e WSMoL também reduziram os níveis fecais de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato, bem como EXT e WSMoL também reduziram os níveis fecais de tirosina, alanina, glicina, etanol e colina. Em conclusão, as preparações de *M. oleifera* foram antibacterianas contra bactérias envolvidas em sepse e FR60 foi a preparação mais eficiente em modular os metabólitos da microbiota intestinal em camundongos obesos e restabelecer o nível glicêmico, melhorar a sensibilidade a insulina e reduzir o quadro inflamatório em camundongos sépticos e obesos.

Palavras-chave: Planta; bactéria; inflamação; Sepsis; Resistência à insulina; Obesidade.

ABSTRACT

The thesis evaluated aqueous extract (EXT), protein fraction (FR60) and WSMoL lectin from *M. oleifera* seeds for antibacterial activity, effect on glycemic control and inflammatory profile in septic mice and effect on inflammation, insulin sensitivity, steatosis liver and fecal metabolites in obese mice fed a high-fat diet. Antibacterial activity was performed by determining the minimum inhibitory (CMI) and minimum bactericidal (CMB) concentrations. Sepsis was induced in Swiss mice and animal survival, fasting glucose, insulin tolerance (ITT) and inflammatory cytokines were determined. Obese animals were evaluated for insulin resistance, glucose tolerance, inflammatory cytokines, histological pattern of epididymal adipose tissue and liver and fecal metabolites. EXT, FR60 and WSMoL presented CMI ranging between 0.03 and 1.10 mg / mL against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Echerichia coli*. Septic mice showed hypoglycemia, insulin resistance and increased serum pro-inflammatory cytokines and treatments with EXT and WSMoL did not reverse the condition while FR60 normalized glycemic levels, improved insulin sensitivity and reduced levels of cytokines TNF- α , IL -2 and IL-6. Obese mice developed insulin resistance, accumulation of liver fat and chronic low-grade inflammation. FR60 treatment improved glucose tolerance and insulin sensitivity and all preparations reduced TNF- α and INF- γ . EXT and FR60 reduced hepatic steatosis, adipocyte hypertrophy and inflammatory cell infiltration into adipose tissue. EXT, FR60 and WSMoL reduced the fecal levels of short-chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate); EXT and WSMoL also reduced fecal levels of tyrosine, alanine, glycine, ethanol and choline. In conclusion, *M. oleifera* preparations were antibacterial against bacteria involved in sepsis and FR60 was the most efficient preparation for modulating the intestinal microbiota metabolites in obese mice and restoring glycemic levels, improving insulin sensitivity and reducing inflammatory conditions in septic and obese mice.

Keywords: Plant; bacterium; inflammation; Sepsis; Insulin resistance; Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	A complexa fisiopatogenia da sepse	25
Figura 2 –	Cascata de citocinas durante a sepse	28
Figura 3 –	Causas e conseqüências da hiperglicemia durante a sepse	30
Figura 4 –	Mecanismos associados a hipoglicemia na sepse	32
Figura 5 –	Causas e conseqüências da obesidade para a saúde	34
Figura 6 –	A sinalização induzida pela ligação LPS-TLR4 ativa o fator de transcrição NFkB	36
Figura 7 –	Principais mecanismos moleculares relacionados aos efeitos dos ácidos graxos saturados (16: 0) e ômega-3 (EPA, DHA) nas vias TLR4 e NF-kB	37
Figura 8 –	Principais funções dos macrófagos na fisiologia do tecido adiposo.....	39
Figura 9 –	Via de sinalização da insulina	41
Figura 10 –	Resumo dos possíveis mecanismos de resistência à insulina na obesidade	42
Figura 11 –	Aspectos gerais de <i>Moringa oleifera</i> . A – Caule de <i>M. oleifera</i> recém plantadas, B – Folha e Flor, C – Fruto, D - Semente	48
Figura 12 –	Esquema ilustrativo do processo de hemaglutinação mediado por lectinas	51
Figura 13 –	Representação ilustrativa da estrutura de lectinas quanto ao domínio de ligação a carboidrato. (A) Merolectinas; (B) Hololectinas; (C) Superlectinas; (D) Quimerolectinas	52
Figura 14 –	Propriedades biológicas e aplicações de lectinas de plantas	53
Figura 15 –	Desenho experimental no modelo de Sepse	59
Figura 16 –	Desenho experimental no modelo de obesidade	60

Artigo 1

- Figura 1 – Glicemia de jejum 24 horas após a indução da sepse (A) e teste de tolerância à insulina (B). A análise estatística foi realizada usando ANOVA one way seguida pelo pós-teste de Bonferroni. A significância estatística é indicada por * ou # $P < 0,05$ (* diferente do controle e # diferente do séptico) 74
- Figura 2– Níveis séricos de citocinas no controle (C), Séptico e Séptico tratado com fração protéica (Séptico FR60). Os dados são média \pm DP (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. A significância estatística é indicada por * OR # $P < 0,05$ (* diferente do controle e # diferente do séptico). 75
- Figura 3 – Análise de sobrevivência. A diferença geral na taxa de sobrevivência foi determinada pelo teste de Kaplan-Meier, seguido por um teste de log-rank. (n = 6 animais por grupo) 76

Artigo 2

- Figura 1 – Efeito fisiológico e metabólico em camundongos controle (C), obesos (OB), obesos tratados com Extrato (OB-EXT), fração proteica (OB-FR60) ou WSMoL (OB-WSMoL). (A) ganho de peso. (B) Ganho de peso médio em 12 semanas. (C) Relação peso do fígado / peso corporal. (D) Relação tecido adiposo / peso corporal. (E) Teste de tolerância à glicose (GTT). (F) Área sob a curva do GTT. Os resultados são expressos como média \pm SEM. n= 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao obeso 96
- Figura 2– Níveis séricos de citocinas em camundongos controle (C), obesos (OB), obesos tratados com Extrato (OB-Ext), fração de proteína (OB-FR60) ou WSMoL (OB-WSMoL). (A) Níveis séricos de TNF- α , (B) Níveis séricos de INF- γ (C) Níveis séricos de IL-2 (D) Níveis séricos de IL-10 (E) Níveis séricos de IL-17 (F) níveis de IL-6 (G) no soro de IL-4. Os dados são média \pm DP (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de *Bonferroni*. A significância estatística é indicada por * OR # $P < 0,05$ (* diferente do controle e # diferente do OB) 98

Figura 3 –	Caracterização morfológica de amostras de tecido hepático. (A) Coloração com hematoxilina e eosina de cortes histológicos de 5 µm do fígado de camundongos controle, OB, OB-EXT, OB-FR60 e OB-WSMoL. (B) Grau de esteatose no fígado. Barra de escala = 20 µm de todas as imagens. Ampliação original 400X. Cada barra representa a média ± S.E.M. de cinco experiências diferentes. * p <0,05 OB vs. grupo controle e #p <0,05 OB-Ext vs. grupo OB	99
Figura 4–	O efeito dos tratamentos com EXT, FR60 e WSMoL na prevalência de *CLSs no tecido adiposo epididimal e tamanho dos adipócitos. (A) Coloração com hematoxilina e eosina de cortes histológicos de 5 µm de tecidos adiposos de camundongos controle, OB, OB-EXT, OB-FR e OB-WSMoL. (B) Área dos adipócitos (C) Quantificação de CLSs. Barra de escala = 20 µm de todas as imagens. Ampliação original × 400. Cada barra representa a média ± S.E.M. * p <0,05 OB vs. grupo controle e #p <0,05 OB-EXT e OB-FR60 vs. grupo OB	100
Figura 5 –	PLS-DA discriminando os extratos fecais dos diferentes grupos experimentais	101
Figura 6 –	VIP do PLS-DA discriminando os metabólitos fecais em camundongos controles, obesos e obesos tratados com EXT, FR60 e proteína WSMoL codificados por cores	102
Figura 7 –	Mapa de calor resumindo mudanças metabólicas dinâmicas em dados espectrais de RMN de 1H de extratos fecais. Vermelho indica concentrações mais altas de metabólitos e azul indica concentrações mais baixas de metabólitos	103

Artigo

Figura 1 –	Study flow diagram	123
------------	--------------------------	-----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 –	Composição química das sementes de <i>M. oleifera</i> (g/100g de peso seco)	49
Artigo 1		
Quadro 1 –	Sistemas, reveladores e padrões utilizados	69
Tabela 1 –	Determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)	73
Artigo 3		
Table 1 –	Summary of risk os bias assessment	121
Table 2 –	<i>In vitro</i> activities of <i>Moringa oleifera</i> against obesity.....	126
Table 3 –	<i>In vivo</i> studies of potential <i>Moringa oleifera</i> against obesity	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Atividade hemaglutinante
AAAs	Aminoácidos aromáticos
AGS	Ácido graxo saturado
AGCCs	Ácidos graxos de cadeia curta
Akt	Proteína quinase B
BCAAs	Aminoácidos de cadeia ramificada
CLP	Ligadura e punção cecal
CMI	Concentrações mínima inibitória
CMB	Concentração mínima bactericida
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CXCL1	Ligante de quimiocina 1
CXCL2	Ligante de quimiocina 2
CXCR3	Receptor de quimiocina CXC tipo 3
DM	Dimetilamina
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DHGNA	Doença hepática gordura não alcoólica
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
EXT	Extrato aquoso de semente de <i>Moringa oleifera</i>
FMO	Flavina mono-oxidase
FR60	Fração proteica de semente de <i>Moringa oleifera</i>
GLUT4	Transportadora de glicose tipo-4
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GMCSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GTT	Teste de tolerância à glicose
HLA-DR	Receptor de antígenos leucocitários humanos - DR
IκB	Inibidores de κB
ITT	Teste de tolerância à insulina
IL-1β	Interleucina-1β
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-17	Interleucina-17

IL-12	Interleucina-12
INF- γ	Interferon – gama
Inos	Óxido nítrico sintase induzível
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JAK1	Janus quinase 1
JAK2	Janus quinase 2
JNK	c-jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Metilamina
MAPK	p38-Proteína kinase ativado por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
<i>M. oleifera</i>	<i>Moringa oleifera</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina
NK	Células natural killer (NK)
NF κ B	Fator nuclear kappa B
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PLS-DA	Regressão dos mínimos quadrados parciais
PI3K	Fosfatidilinositol 3 – quinase
RRPs	Receptores de reconhecimento de padrões
STAT1	Sinal transdutor e ativador da transcrição proteica 1
TLRs	Receptores Toll-like
TLR4	Receptores Toll-like tipo 4
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TMA	Trimetilamina
TNF- α	Fator de necrose tumoral -alfa
TH1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
TH17	Linfócitos T auxiliares tipo 17
VIP	Variable importance in the projection
WSMoL	Lectina de semente de <i>Moringa oleifera</i> solúvel em água

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	SEPSE: DEFINIÇÃO E FISIOPATOLOGIA.....	22
2.2	CITOCINAS E SEPSE	25
2.3	REGULAÇÃO METABÓLICA DA GLICOSE NA SEPSE ..	28
2.4	OBESIDADE E EPIDEMIOLOGIA.....	32
2.5	INFLAMAÇÃO E TECIDO ADIPOSEO	34
2.6	RESISTÊNCIA À INSULINA E INFLAMAÇÃO.....	39
2.7	MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE.....	43
2.8	<i>Moringa oleifera</i>	47
2.9	LECTINAS.....	50
2.10	WSMoL.....	54
3	MÉTODOS	56
3.1	PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE SEMENTES DE <i>M. Oleifera</i>	56
3.2	ESTIRPES BACTERIANAS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS.....	56
3.3	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).....	57
3.4	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	58
3.5	INDUÇÃO DE SEPSE E TRATAMENTO.....	58
3.6	INDUÇÃO DE OBESIDADE E TRATAMENTO.....	59
3.7	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA.....	60
3.8	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	61
3.9	DOSAGEM DE CITOCINAS	61
3.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	62
3.11	PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE AMOSTRAS FECAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	62

3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
4	RESULTADOS	64
4.1	ARTIGO 1 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITOS NO CONTROLE GLICÊMICO E PERFIL INFLAMATÓRIO DE EXTRATO, FRAÇÃO PROTEICA E LECTINA DE SEMENTES DE <i>Moringa oleifera</i> EM CAMUNDONGOS SÉPTICOS	64
4.2	ARTIGO 2 – PREPARAÇÕES DE SEMENTES DE <i>Moringa oleifera</i> MODULAM METABÓLITOS FECAIS, MELHORAM A TOLERÂNCIA À GLICOSE, REDUZEM INFLAMAÇÃO E ESTEATOSE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS OBESOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA	87
4.3	ARTIGO 3 – POTENCIAL ANTIPOBESOGÊNICO DE <i>Moringa oleifera</i> : UMA REVISÃO SISTEMÁTICA	115
5	CONCLUSÃO	140
	REFERÊNCIAS	141
APÊNDICE A –	PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE)	165
ANEXO A –	ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODICO ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA	166
ANEXO B –	ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERÍODICO ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS	176

1 INTRODUÇÃO

O crescimento de resistência microbiana aos antibióticos é um dos graves problemas de saúde pública do século. Devido à resistência microbiana e a falta de novos antibióticos, observa-se um aumento na gravidade das doenças infecciosas e o risco de complicações associadas a infecções graves, que podem levar a sepse (ARIAS; MURRAY, 2015; DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014). A sepse é caracterizada pela ocorrência de uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica com disfunção orgânica, desencadeada por uma reação inadequada à infecção (HUANG; CAI; SU, 2019). A resposta inflamatória aguda exacerbada e a desregulação glicêmica durante a hospitalização por sepse conferem disfunção orgânica sistêmica com elevado risco de mortalidade (ALEMAN; GUERRERO, 2018; LIU et al., 2018). Nenhuma droga terapêutica específica e eficaz para uso clínico em pacientes sépticos está disponível, e antibióticos, fluidos intravenosos, corticosteroides e agentes vasoativos têm sido usados para o tratamento tradicional da sepse (PERNER et al., 2016; ROCHWERG et al., 2018). Logo, faz-se necessário a busca por novos agentes terapêuticos focados principalmente na regulação da resposta inflamatória sistêmica e controle da disfunção metabólica, com a finalidade de restaurar a homeostase e melhorar o prognóstico do paciente.

A obesidade, caracterizada por uma inflamação subclínica crônica, é atualmente definida como uma pandemia e um dos maiores problemas de saúde pública de todos os tempos. O excesso de peso está associado ao desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), doença cardiovascular e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (FRIEDMAN et al., 2018; PARNELL et al., 2012). Os medicamentos anti-obesidade atualmente utilizados na prática clínica mostraram efeitos colaterais graves, que superam seus efeitos benéficos (KANG; PARK, 2012; SOLOMON et al., 2017). Como alternativa de tratamento da obesidade e suas complicações estão os produtos naturais que incluem plantas medicinais, seja como compostos bioativos isolados ou como extratos brutos (MOPURI; ISLAM, 2017).

Moringa oleifera (*M. oleifera*) é uma planta cultivada em diversas regiões tropicais de todo o mundo, incluindo o nordeste brasileiro (FERREIRA et al. 2008). Trata-se de um vegetal de múltiplos usos e que apresenta uma grande variedade de

propriedades nutricionais e medicinais (ALMATRAFI et al., 2017; SAA et al., 2019). As sementes de *M. oleifera* contêm lectinas que podem ser utilizados no tratamento de água para consumo humano (SÁNCHEZ-MARTÍN; BELTRÁN-HEREDIA; PERES, 2012). Lectinas são proteínas com capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos e aglutinarem células. Nas plantas estão presentes em todos os órgãos, embora encontradas em maior quantidade nas sementes. Apresentam distribuição e atividade biológica em todos os organismos vivos, estando envolvidas no processo de reconhecimento celular e sinalização em diversas vias metabólicas (KUMAR et al., 2012; WU; LIU, 2019).

A lectina de semente de *M. oleifera* solúvel em água, denominada WSMoL, apresentou atividades antibacteriana, anti-inflamatória e imunomoduladora in vitro (Santos et al. 2014; Moura et al. 2017, 2015; L. C. C. Araújo et al. 2013; Coriolano et al. 2018). O extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* também demonstrou efeito anti-inflamatório em modelo de pleurisia, bem como exibiu um efeito hipoglicemiante em modelo de diabetes mellitus tipo I induzida por aloxana (AJIBOLA; EUNICE; STEPHANIE, 2014a).

Desde que preparações obtidas da semente de *M. oleifera* apresentam efeitos antibacterianos, anti-inflamatórios e hipoglicemiantes promissores, é interessante avaliar os efeitos metabólicos dessas preparações em modelos de camundongos sépticos e obesos. A presente tese avaliou a atividade antibacteriana de extrato aquoso (EXT), fração proteica (FR60) e WSMoL isolada de sementes de *M. oleifera*, e investigou o efeito dessas preparações sobre o controle glicêmico e perfil inflamatório em camundongos sépticos. Adicionalmente, os efeitos de EXT, FR60 e WSMoL foram avaliados sobre perfil dos metabólitos fecais, inflamação, sensibilidade à insulina e esteatose hepática em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de preparações obtidas de semente de *M. oleifera* (extrato aquoso, EXT; fração proteica, FR60; e WSMoL) e investigar os efeitos dessas preparações sobre os níveis glicêmicos e perfil inflamatório em modelos de sepse e obesidade.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana de EXT, FR60 e WSMoL frente às principais espécies de bactérias envolvidas na sepse;
- Avaliar sobrevida de camundongos sépticos;
- Analisar parâmetros fisiológicos (glicemia de jejum e sensibilidade à insulina) de camundongos sépticos;
- Mensurar os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- α ; INF- γ ; IL-6; IL-2; IL-4; IL-17; IL-10) de camundongos sépticos;
- Analisar parâmetros fisiológicos (glicemia de jejum, sensibilidade à insulina e tolerância à glicose) de camundongos obesos;
- Mensurar os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- α ; INF- γ ; IL-6; IL-2; IL-4; IL-17; IL-10) de camundongos obesos;
- Verificar o nível de hipertrofia de adipócitos e de infiltração de células inflamatórias em tecido adiposo de camundongos obesos;
- Mensurar o nível de esteatose hepática em camundongos obesos;
- Investigar perfil de metabólitos fecais em camundongos obesos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SEPSE: DEFINIÇÃO E FISIOPATOLOGIA

O termo sepse, que em grego significa “putrefação”, foi mencionado na obra de Homero, utilizado por Hipócrates, Aristóteles, Plutarco e Galeno, e tem sido usada há cerca de 2.700 anos (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009). Durante décadas, a sepse foi considerada uma disseminação sistêmica de infecção, envolvendo o comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas, com alta taxa de morbimortalidade (ESPER et al., 2006; MARTIN et al., 2003). O entendimento de que as manifestações sistêmicas da infecção poderiam ocorrer por meio de mediadores inflamatórios, sem a necessidade de disseminação do microrganismo, levou ao moderno conceito de sepse (LEVY; EVANS; RHODES, 2018).

De acordo com o Terceiro Consenso Internacional de Sepse e Choque Séptico, publicado em 2016, sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (SINGER et al., 2016). Estima-se que a sepse afeta mais de 30 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo e é uma das principais causas de morte em pacientes hospitalizados. Em recente estudo multicêntrico realizado no Brasil, um terço dos leitos de terapia intensiva eram ocupados por pacientes sépticos, com mortalidade de 55,7% (MACHADO et al., 2017). Além disso, o aumento da resistência antimicrobiana tem sido motivo de preocupação, uma vez que está associada a internações mais prolongadas em hospitais, uso de enfermarias de isolamento, medidas rigorosas de controle de infecção e falhas no tratamento, contribuindo para aumento nas taxas de mortalidade (ZAMAN et al., 2017).

Clinicamente, quase 95% dos casos de sepse são causados por infecção bacteriana. Os patógenos etiológicos mais comuns são as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativo*) seguido de Gram-negativos, em especial a *Escherichia coli* (MARTIN, 2012; VENDEMIATO et al., 2015). Bactérias resistentes aos antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), são frequentemente detectadas em pacientes sépticos com aquisição de infecção hospitalar (VENDEMIATO et al. 2015). A patogênese da sepse é complexa e envolve múltiplos aspectos da interação entre os

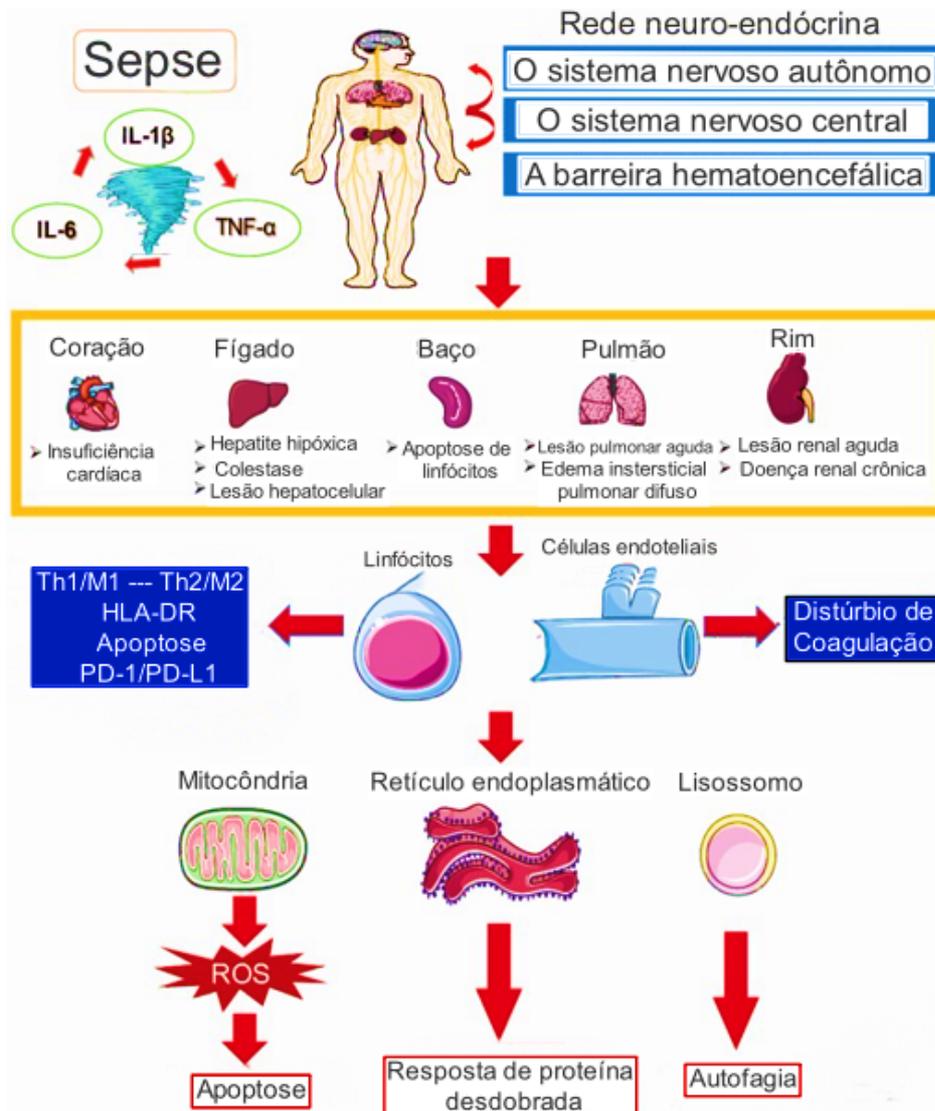
microrganismos infectantes e o hospedeiro. O reconhecimento de patógenos e a ativação de células imunológicas são fundamentais para o controle da infecção. Paradoxalmente, a resposta inflamatória do hospedeiro também é a base inicial para as alterações fisiopatológicas na sepse.

Durante a infecção, o patógeno invasor encontra o sistema imunológico inato do hospedeiro e as células inatas reconhecem os patógenos através de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) por meio de uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo receptores Toll-like (TLRs). (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Na maioria dos casos, o sistema imunológico inato é eficiente em montar uma resposta protetora e equilibrada às infecções, e isso resulta na eliminação do patógeno por meio de uma variedade de reações pró-inflamatórias, como a liberação de citocinas e quimiocinas, o recrutamento de fagócitos, e a ativação local dos sistemas complemento e de coagulação, seguido por um retorno à homeostase. No entanto, durante algumas infecções, o patógeno prevalece e consegue se multiplicar, apesar da resposta imunológica.

A resposta inicial do hospedeiro durante a sepse é caracterizada por inflamação excessiva, a qual está associada à liberação de mediadores pró-inflamatórios, culminando com uma “tempestade de citocinas”, que leva a lesão celular e liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), disfunções orgânicas e catabolismo (CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017; VENET; RIMMELÉ; MONNERET, 2018). Em estágio posterior, a sepse pode repercutir com um quadro de supressão imunológica. A supressão imunológica envolve os sistemas imunológicos adaptativo e inato, e é caracterizada pela apoptose de linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas e a reprogramação de células apresentadoras de antígeno que levam à redução da expressão do receptor de antígenos leucocitários humanos - DR (HLA-DR) e diminuição da capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias (HUANG; CAI; SU, 2019). O equilíbrio entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória durante a sepse é um ponto chave no controle da infecção, uma vez que a predominância da resposta inflamatória leva à disfunção orgânica e morte, enquanto uma predominância da resposta anti-inflamatória, a chamada imunossupressão da sepse, pode levar à persistência de focos de infecção ou ao desenvolvimento de novas infecções secundárias ou mesmo oportunistas e posterior óbito (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013; STORTZ et al., 2019).

Como descrito na figura 1, a nível celular e molecular, a patogênese da sepse é extremamente complexa, incluindo desequilíbrio na resposta inflamatória, disfunção imunológica, dano mitocondrial, coagulopatia, anormalidades da rede neuro-endócrina, estresse do retículo endoplasmático, autofagia e outros processos fisiopatológicos que levam as disfunções orgânicas. A liberação de mediadores inflamatórios induz uma grave disfunção macro e microcirculatória que leva a uma hipoperfusão global profunda, causando lesões em múltiplos órgãos (CARABALLO; JAIMES, 2019). Consequentemente, pacientes com sepse podem apresentar disfunção de praticamente qualquer sistema, independentemente do local da infecção. Os órgãos mais frequentemente afetados são os rins, fígado, pulmões, coração, sistema nervoso central e sistema hematológico órgãos (CARABALLO; JAIMES, 2019).

Figura 1. A complexa fisiopatogenia da sepse.



Fonte: HUANG; CAI; SU (2019)

2.2 CITOCINAS E SEPSE

As citocinas compreendem uma ampla categoria de proteínas relativamente pequenas (<40 kDa) que desempenham importante função imunomoduladora. Como esquematizado na figura 2, as citocinas apresentam inúmeras atividades durante o processo infeccioso, como ativação, proliferação e migração de células imunológicas, e durante a sepse estão associadas aos processos de dano celular, apoptose e necrose, culminando em falência múltipla de órgãos e morte (SHI et al., 2020; WEN; CROWLEY, 2019). A taxonomia das citocinas é altamente complexa e é baseada em ordem de descoberta, estrutura, ligação a célula-alvo ou função. As citocinas podem ser divididas em várias categorias que incluem, as interleucinas

(IL), interferons (INF), quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento.

As interleucinas são o grupo mais importante de citocinas liberadas durante os processos infecciosos. Eles abrangem uma grande variedade de proteínas secretadas por leucócitos e células endoteliais, entre outros tipos celulares, e que contribuem para a sinalização celular promovendo ativação, proliferação, morte e/ou motilidade das células imunes. Elas são didaticamente divididas em interleucinas pró e anti-inflamatórias. As interleucinas pró-inflamatórias são associadas a ativação celular, dano ao tecido e necrose, enquanto as interleucinas anti-inflamatórias visam reduzir e finalmente reverter o processo inflamatório. Entre as numerosas citocinas pró-inflamatórias estudadas durante a sepse, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-17 são de grande importância. A IL-1 β é produzida e secretada por vários tipos celulares, especialmente por monócitos e macrófagos. IL-1 leva à ativação das vias inflamatórias das c-Jun N-terminal quinases (JNK) e da Proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38-MAPK) e aumenta a atividade do factor nuclear kappa B (NF κ B). IL-1 β promove a cascata de amplificação e induz a síntese de várias proteínas inflamatórias, como IL-6, IL-8, proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), IL-1 β entre outras. Durante a sepse, os níveis de IL-1 β se mostram mais elevados em pacientes que progrediram para óbito do que em sobreviventes, sugerindo uma associação de altos níveis de IL-1 β e maior risco de mortalidade (KORKMAZ et al., 2018).

A IL-6 é caracterizada como uma interleucina pleiotrópica e seu papel na “tempestade de citocinas” durante a sepse é complexo e controverso. A principal fonte de IL-6 são os macrófagos teciduais. Altos níveis de IL-6 são observados em muitas doenças infecciosas e inflamatórias (COPAESCU et al., 2020; GOUEL-CHÉRON et al., 2012; ZHUANG et al., 2017). Similarmente à IL-1 β , níveis elevados de IL-6 foram consistentemente associados à gravidade da sepse e os níveis mais altos associados ao pior prognóstico (KANG et al., 2017; KLAG et al., 2016). A IL-12 também está elevada durante a sepse. Esta citocina, produzida por células dendríticas, macrófagos e linfoblastos, induz a diferenciação de linfócitos T *naïve* em linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) e ativa células *natural killer* (NK); como resultado, estas células irão produzir uma grande quantidade de INF γ (HSIEH et al., 1993). IL-17 é produzida pelos linfócitos Th17 após estimulação por IL-23 e induz a síntese de uma ampla variedade de citocinas: fator estimulador de colônias de granulócitos e

macrófagos (GM-CSF), interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e quimiocinas (IL-8, MCP-1), por muitos tipos celulares, como células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos ou macrófagos (COSTA; MATTANA; DA SILVA, 2010; REYNOLDS; ANGKASEKWINAI; DONG, 2010).

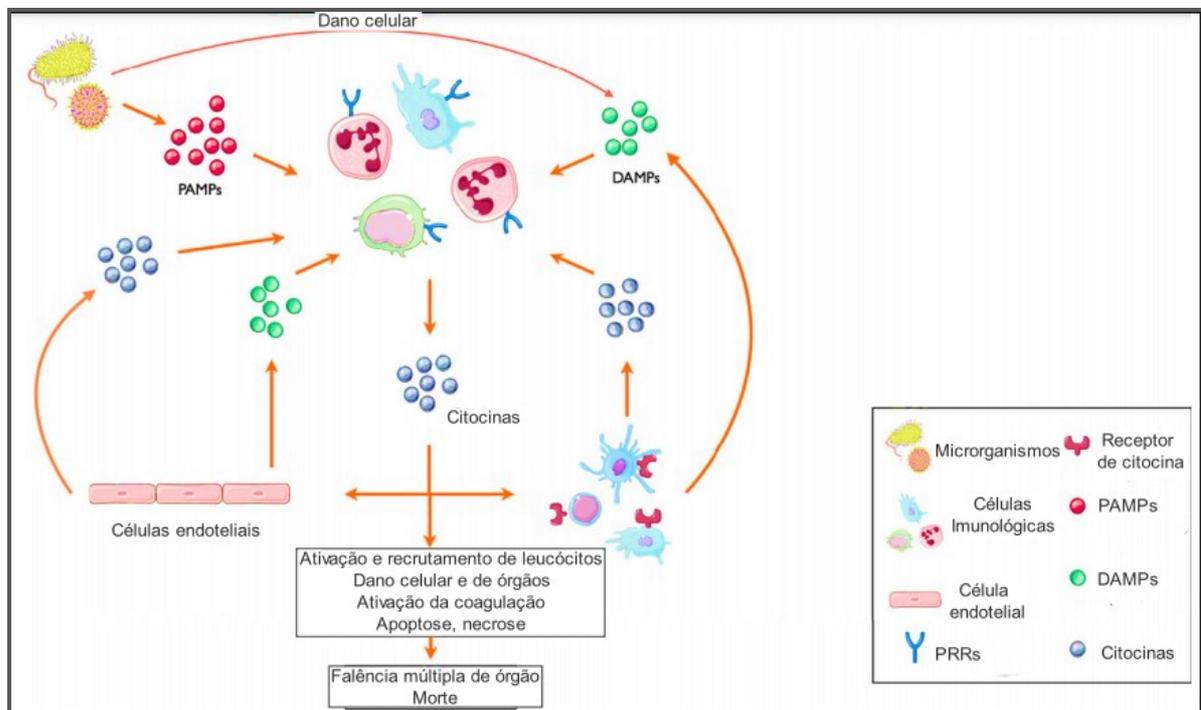
Os interferons são classificados em três tipos principais de acordo com a sua especificidade de receptor. IFNAR1 / IFNAR2 é o receptor heterodimérico para interferon tipo I (IFN- α e IFN- β), enquanto IFN- γ R1 / IFN- γ R2 é o receptor para IFN tipo II (IFN- γ). IFN- γ é produzido principalmente por células T CD4 e CD8, embora as células NK também produzam, mas em menor extensão (DANIEL et al., 2011; SCHOENBORN; WILSON, 2007). O IFN- γ é geralmente usado para definir células do tipo Th1. O IFN- γ depende principalmente das vias de sinalização Janus quinase 1 e 2 (JAK1 e JAK2), p38-MAPK e do sinal transdutor e ativador da transcrição proteica 1 (STAT1). IFN- γ contribui para a resposta inflamatória durante a sepse, mas sua produção é amortecida durante a sepse, provavelmente devido a hiporresponsividade dos linfócitos durante o estado de imunossupressão (ROMERO et al., 2010).

Quimiocinas (CKs) são pequenas moléculas (8-12 kDa), geralmente solúveis, não apenas especializadas no recrutamento, mas também na ativação de células imunes. Em contraste com outras citocinas que têm amplos efeitos em muitas células, as CKs geralmente apresentam especificidade por um tipo celular. Por exemplo, MCP-1 ou CX3CL1 são quase específicos para monócitos, ligante de quimiocina 1 e 2 (CXCL1 e CXCL2) para neutrófilos, e receptor de quimiocina C-X-C tipo 3 (CXCR3) para linfócitos T. Seu papel na fisiopatologia da sepse está associado ao recrutamento de leucócitos para o local da infecção e à liberação de células imunes da medula óssea ou baço. Uma vez recrutados, os leucócitos irão fagocitar bactérias e células mortas promovendo diretamente a inflamação por todo o organismo. Em contrapartida, a falta de CKs ou de seus receptores leva a um estado de imunossupressão, tornando o organismo mais suscetível à letalidade induzida pela infecção (CHOUSTERMAN et al., 2016; LIONAKIS et al., 2013).

O TNF- α pertence a uma família de citocinas solúveis e ligadas às células que tem uma ampla gama de funções, como promover a inflamação, proliferação celular e apoptose (NI et al., 2016; SELEME et al., 2017; ZHANG et al., 2019). Como seu nome indica, os efeitos citotóxicos ou apoptóticos do TNF- α conferem proteção contra a geração de tumor. Além disso, o TNF- α promove a reparação tecidual, bem

como processos regenerativos e proliferativos. Essa citocina pró-inflamatória é produzida por células imunes, principalmente linfócitos T, embora outros leucócitos, células endoteliais vasculares e células epiteliais tubulares renais e mesangiais também possam produzi-la. TNF- α é indetectável ou encontrado em baixas concentrações na circulação sanguínea em condições normais, mas sua produção e secreção aumentam no quadro de inflamação. Na sepse, altos de níveis de TNF- α se correlacionam com maior gravidade e pior prognóstico (LENDAK et al., 2018). O bloqueio de TNF- α reduz o processo inflamatório local e sistêmico e melhorar a sobrevida durante a sepse (TRACEY et al., 1987).

Figura 2. Ativação de células imunológicas e o papel das citocinas durante a sepse



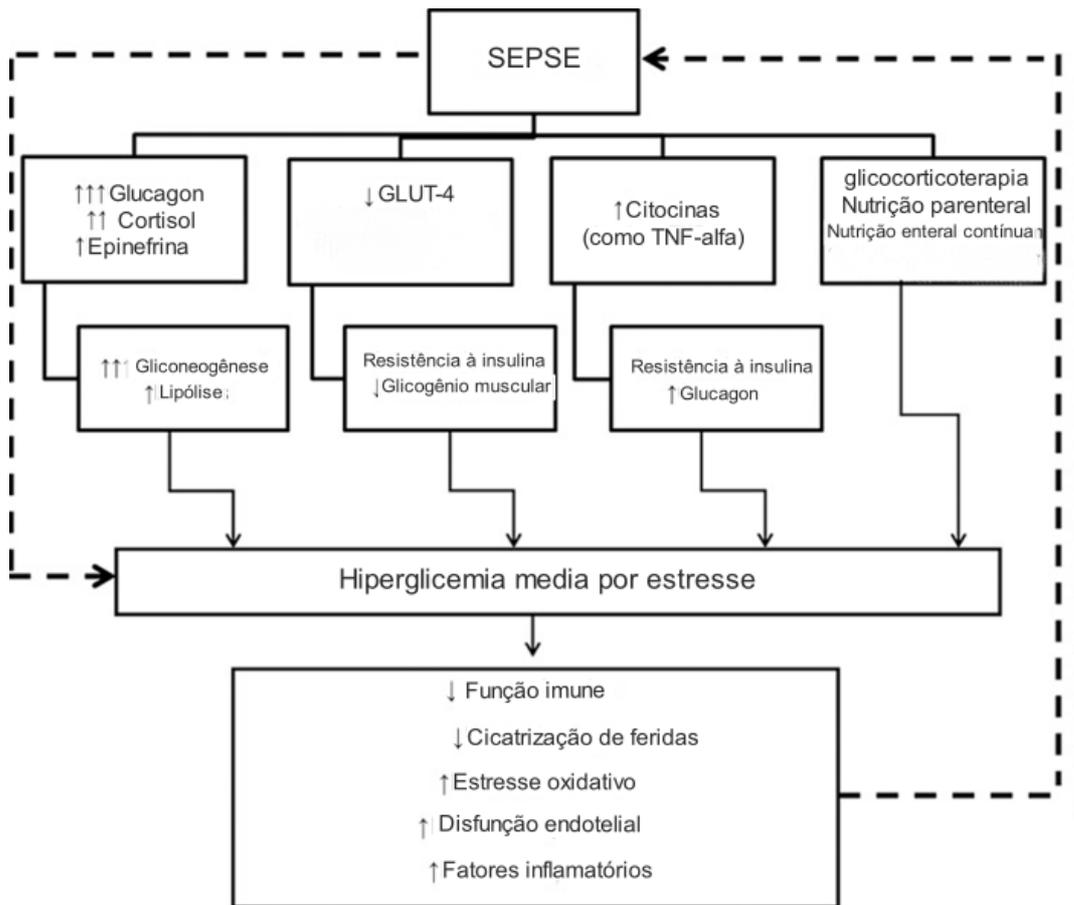
Fonte: CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER (2017)

2.3 REGULAÇÃO METABÓLICA DA GLICOSE NA SEPSE

A patogênese da sepse é apenas parcialmente explicada pelo desequilíbrio da resposta inflamatória, enquanto a desregulação metabólica, levando à disfunção orgânica e, eventualmente, à falência de órgãos, é cada vez mais reconhecida como um componente importante desse processo (WEIS et al., 2017). Embora os mecanismos subjacentes à resposta inflamatória que caracteriza a patogênese da sepse sejam bem descritos, aqueles que conduzem a desregulação metabólica e

falha de múltiplos órgãos permanecem inconclusivos (POOL; GOMEZ; KELLUM, 2018). Alterações metabólicas, caracterizadas por desregulação no metabolismo da glicose, resistência à insulina e alterações no suprimento de energia intracelular em células periféricas e imunes, desempenham um papel central no desenvolvimento da insuficiência metabólica e energética associada à patogênese da sepse (MARIK; BELLOMO, 2013).

O desenvolvimento de hiperglicemia é uma resposta metabólica adaptativa ao estresse induzido pela sepse. A hiperglicemia é induzida por hormônios do estresse (cortisol, hormônio do crescimento, glucagon e catecolaminas) e citocinas pró-inflamatórias, levando a glicogenólise e gliconeogênese hepática e resistência à insulina periférica (Figura 3). Drogas como catecolaminas e corticosteroides, que aumentam a resistência à insulina, bem como nutrição (parenteral), podem promover e agravar o grau de hiperglicemia em pacientes hospitalizados (INGELS; VANHOREBEEK; VAN DEN BERGHE, 2018). A resposta hiperglicêmica ao estresse, descrita pela primeira vez por Selye (1956), costumava ser interpretada como um processo adaptativo desejável, com a hipótese de fornecer uma vantagem de sobrevivência ao fornecer nutrientes suficientes para células que não dependem da insulina para a captação de glicose, incluindo neurônios e leucócitos (INGELS; VANHOREBEEK; VAN DEN BERGHE, 2018). No entanto, existe uma relação entre o grau de hiperglicemia com um aumento do risco de mortalidade (ALEMAN; GUERRERO, 2018). As consequências da hiperglicemia, demonstrados por ensaios clínicos em humanos, são: maior risco de quadros protrombóticos, reatividade do endotélio vascular e prejuízos na quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos (DIXON, 2004; JAFAR; EDRISS; NUGENT, 2016; ZHANG et al., 2016). Estudos mostraram que a normalização da concentração de glicose no sangue para a faixa de jejum de indivíduos saudáveis com terapia com insulina, foi associada à redução de morbidade e mortalidade em pacientes criticamente doentes (GUPTA et al., 2020; VIANA et al., 2014; VLASSELAERS et al., 2009). Portanto, parece prudente evitar a hiperglicemia grave em pacientes sépticos.



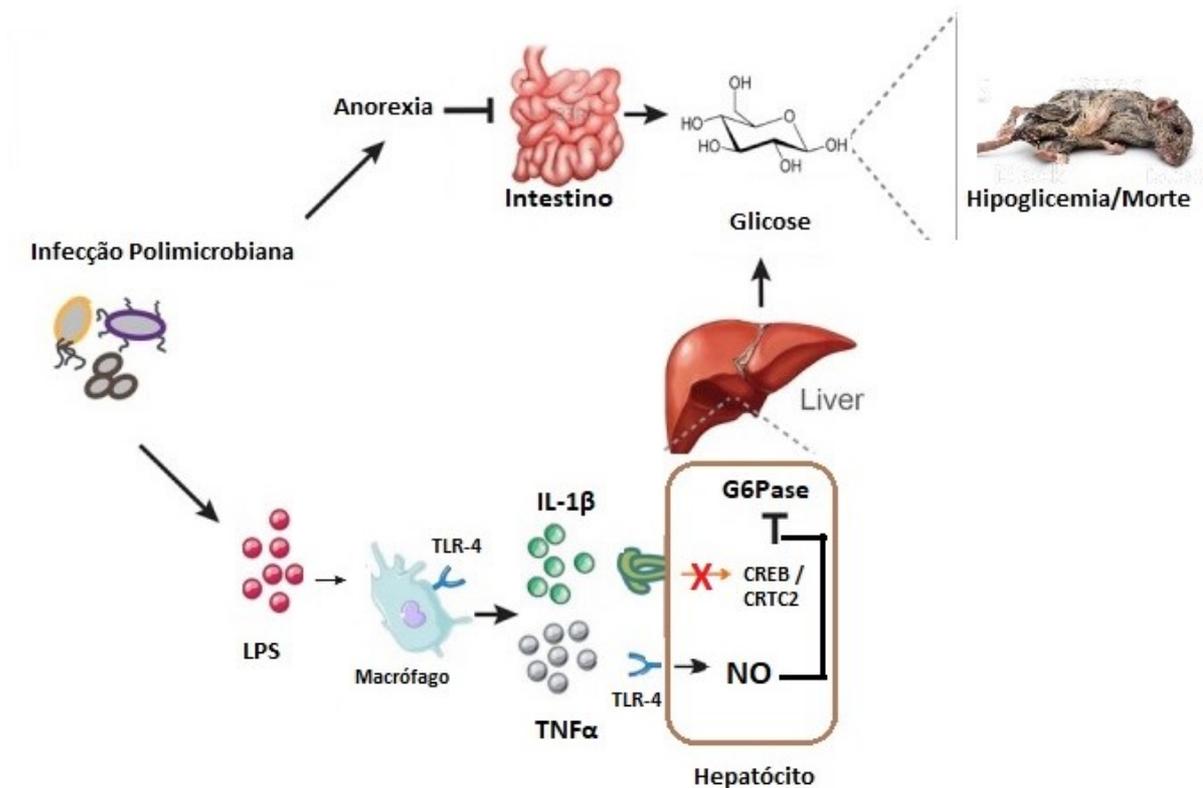
Fonte: VIANA et al. (2014)

A sepse causa não apenas hiperglicemia, mas também hipoglicemia. Embora a incidência de hipoglicemia seja marcadamente menor do que a da hiperglicemia, os mecanismos subjacentes à hipoglicemia na sepse devem ser considerados. A hipoglicemia é uma causa considerável de morbidade e mortalidade na sepse, tanto em animais experimentais como em humanos (ALEMAN et al., 2018; FURUKAWA et al., 2019; SSEKITOLEKO et al., 2011). Estudos vêm sendo realizados na tentativa de elucidar os mecanismos de hipoglicemia na sepse utilizando modelos animais. Um estudo experimental em camundongos mostrou que durante a evolução da sepse a ingestão nutricional reduzida associada à anorexia da infecção contribui para um estado de hipoglicemia (FERREIRA et al., 2017). Outro estudo, mostrou que a ativação de receptores TLR4 por lipopolissacarídeos (LPS), um componente derivado da parede celular de bactérias Gram-negativas, apesar de sua capacidade de induzir resistência à insulina, também é capaz de reduzir os níveis da enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase) e, dessa forma, diminuir a produção hepática de glicose (TANAKA et al., 2017). LV et al. (2016), já haviam mostrado que a supressão

da gliconeogênese hepática desencadeada pela via do receptor TLR4 em resposta ao LPS, ocorre pelo bloqueio da ativação dos coativadores CREB/CRTC2 pela IL-1 β liberada por macrófagos. Um resumo dos mecanismos associados a hipoglicemia na sepse está esquematizado na Figura 4. Interessantemente, o aumento da expressão de ferritina, que se encontra reduzida em camundongos sépticos induzidos por CLP, inibe a expressão de espécies reativas de oxigênio mediada pelo acúmulo de ferro em hepatócitos, e melhora a expressão e atividade da G6Pase, sustentando a gliconeogênese e mantendo os níveis de glicose no sangue dentro de uma faixa dinâmica e compatível com a sobrevivência (WEIS et al. 2017).

O entendimento da homeostase da glicose é importante para verificar como o organismo se adapta a esse contexto séptico e para apoiar as alternativas terapêuticas adequadas nesse momento crítico. Nesse sentido, a utilização de compostos naturais que neutralizem o desequilíbrio glicêmico pode ser útil para a prevenção e/ou tratamento de distúrbios metabólicos relacionada à sepse.

Figura 4. Mecanismos associados a hipoglicemia na sepse.



Adaptado de WEIS et al., 2017

2.4 OBESIDADE E EPIDEMIOLOGIA

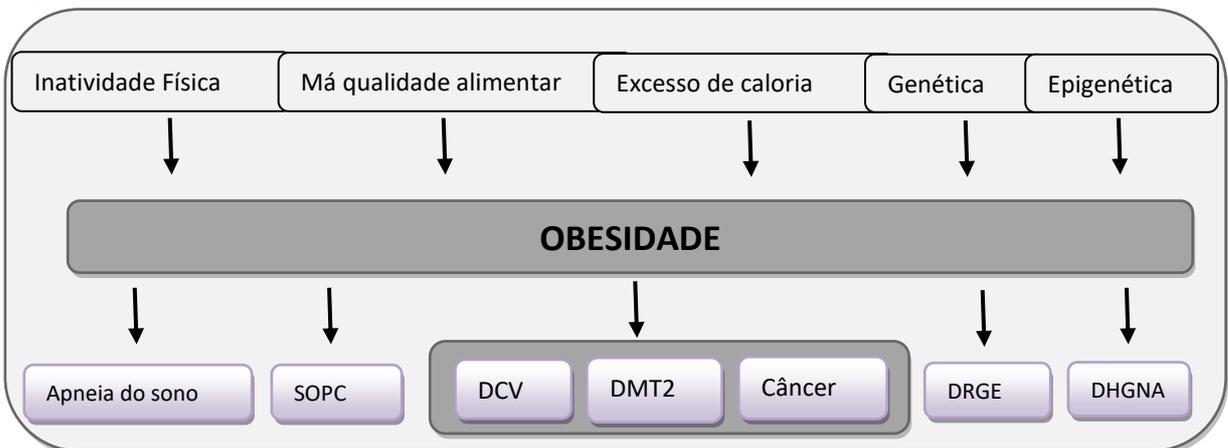
A obesidade é definida como uma condição crônica multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o índice de massa corporal (IMC) é reconhecido como padrão internacional para avaliar o grau de sobrepeso e obesidade, sendo estes caracterizados por $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, respectivamente. Quanto aos fatores condicionantes da obesidade, destacam-se fatores genéticos e epigenéticos, hábitos alimentares inadequados, como o consumo excessivo de alimentos ultraprocessados e o sedentarismo (AROCHA RODULFO, 2019; FARDET, 2018; TANG et al., 2014).

O aumento da prevalência da obesidade é atualmente considerado uma epidemia mundial que afeta significativamente a saúde humana (JAACKS et al., 2019). Globalmente, estima-se que o sobrepeso e obesidade atingem aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (ABARCA-GÓMEZ et al., 2017). Outro dado alarmante é o aumento do sobrepeso e obesidade infantil, sendo estimados 213 milhões de crianças e adolescentes com sobrepeso e 124 milhões obesos (ABARCA-GÓMEZ et al., 2017). No Brasil o sobrepeso atinge 56,9% da população e a obesidade corresponde a 20,8%, o que totaliza aproximadamente 160 milhões de brasileiros acima do peso ou obesos (IBGE, 2015).

Conforme descrito na Figura 5, o excesso de peso é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e alguns tipos de câncer (FUSTER et al., 2016; SALTIEL; OLEFSKY, 2017; VOLACO et al., 2018; WANG et al., 2019). O desenvolvimento de resistência à insulina, uma condição necessária para instalação do DMT2, está diretamente relacionado com as complicações decorrentes da obesidade (DEFRONZO; TRIPATHY, 2009). Estima-se que 366 milhões de pessoas no mundo são portadoras de DMT2, sendo cerca de 55% dos casos desta patologia atribuídas à obesidade (OLOKOBA; OBATERU; OLOKOBA, 2012). No Brasil, um estudo já havia mostrado que 75% da população com DMT2 não estava no peso ideal sendo 42,1% com sobrepeso e 32,9% com obesidade (GOMES et al., 2006).

O tecido adiposo não é considerado somente um armazenador de energia, mas também um órgão endócrino com funções de sintetizar e liberar proteínas biologicamente ativas, denominadas adipocinas, com ações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (AHL et al., 2015; LÊ et al., 2011). O excesso de tecido adiposo leva a um estado de inflamação crônica de baixo grau, induzindo o recrutamento de macrófagos em resposta à quimiotaxia e assim liberando as adipocinas pró-inflamatórias, que são capazes de induzir alterações na via intracelular da insulina (WU; BALLANTYNE, 2017). Assim os mecanismos moleculares que explicam a relação da obesidade, inflamação e o desenvolvimento de resistência à insulina já são bem compreendidos.

Figura 5. Causas e consequências da obesidade para a saúde.



Abreviaturas: SOP: síndrome dos ovários policísticos; DCV: doença cardiovascular; DMT2: diabetes mellitus tipo 2; DHGNA: doença hepática gordurosa não alcoólica; DRGE: doença do refluxo gastroesofágico. Fonte: BURHANS et al., 2018.

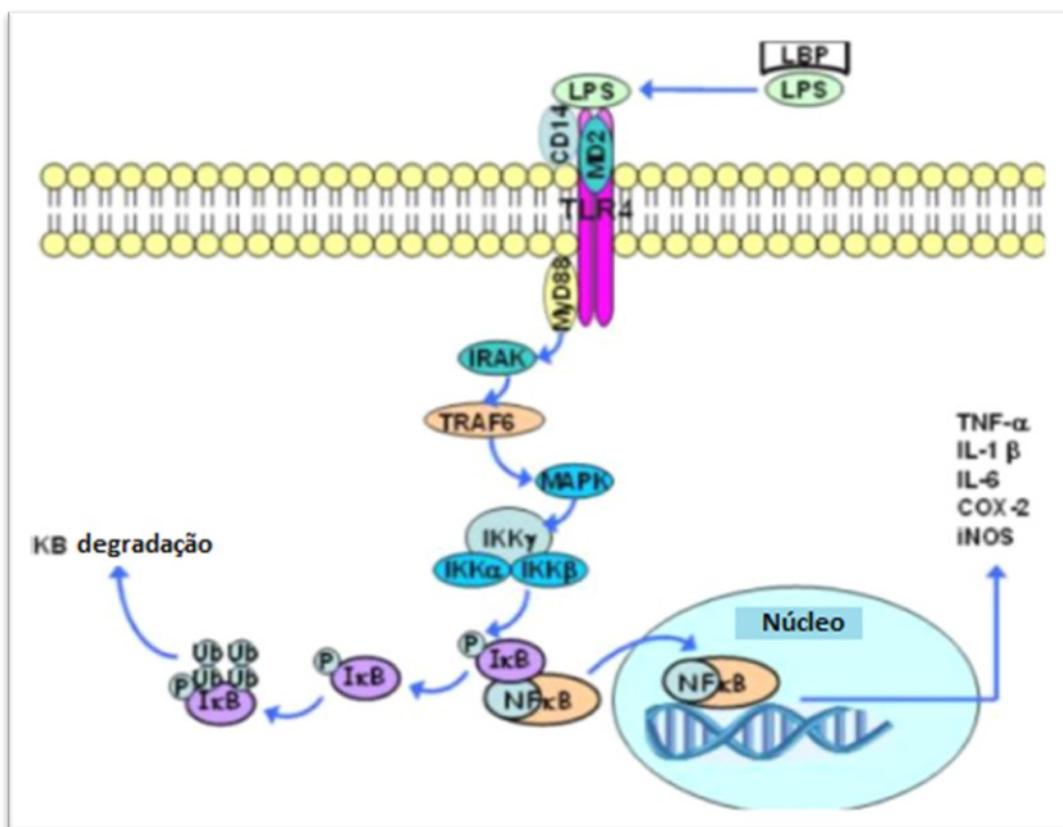
2.5 INFLAMAÇÃO E TECIDO ADIPOSEO

O processo inflamatório que ocorre na obesidade difere da resposta inflamatória clássica, uma vez que se manifesta sistemicamente e é caracterizado por uma reação crônica de baixa intensidade (SHALITIN; MORENO, 2018). Nesse contexto, estudos apontam que a instalação de um estado inflamatório a partir de uma dieta com alto teor de gordura pode ser proveniente da translocação de produtos da microbiota intestinal, em especial o LPS (CANI et al., 2012; DALBY et al., 2018; ROCHA et al., 2016).

O LPS é também referido como uma endotoxina bacteriana capaz de promover estímulo muito potente de respostas inflamatórias na maioria dos mamíferos (COCHET; PERI, 2017). Cani et al. (2007) relataram que alimentar camundongos com uma dieta muito rica em gordura (72% da energia total) ao longo de 4 semanas aumenta significativamente as concentrações de LPS circulante em comparação aos camundongos controles alimentados com dieta de baixo teor de gordura. DALBY et al. (2018), também relataram aumento dos níveis plasmáticos de LPS em camundongos alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica (60 kcal% de gordura). Esses dados sugerem que a alimentação rica em gordura resulta em elevação crônica da endotoxina circulante.

O LPS circulante se liga a receptores do tipo TLR4 presente em macrófagos e outras células do sistema imune (COCHET; PERI, 2017; LU; YEH; OHASHI, 2008). O TLR4 faz parte de uma família maior de receptores responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs e estão presentes em células de humanos e camundongos (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). Esses receptores são expressos por todo o corpo e são críticos para a defesa do hospedeiro contra patógenos invasores. A sinalização através de TLR4 leva à ativação de NF- κ B, um fator de transcrição que subsequentemente ativa a expressão de numerosas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (Figura 6). O fator de transcrição NF- κ B se apresenta inativo sob a forma de dímero associado a inibidores de κ B (I κ B) no citoplasma de células não estimuladas. A interação entre LPS e TLR4 reúne proteínas da família de quinase associada ao receptor da IL-1 (IRAK), levando a sua posterior associação com o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6). O TRAF6 ativa então as proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK). A Via MAPK/TRAF6, por sua vez ativa o complexo I κ B quinase (IKK), que é composto de duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e uma subunidade reguladora (IKK γ), e tem a capacidade de induzir a fosforilação de I κ B. Finalmente, a fosforilação do I κ B por IKK leva a sua subsequente degradação permitindo que o dímero de NF- κ B seja translocado para o núcleo e ative a transcrição de muitos genes dependentes de dessa via, tais como os genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, e óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Figura 6. A sinalização induzida pela ligação LPS-TLR4 ativa o fator de transcrição NF κ B.

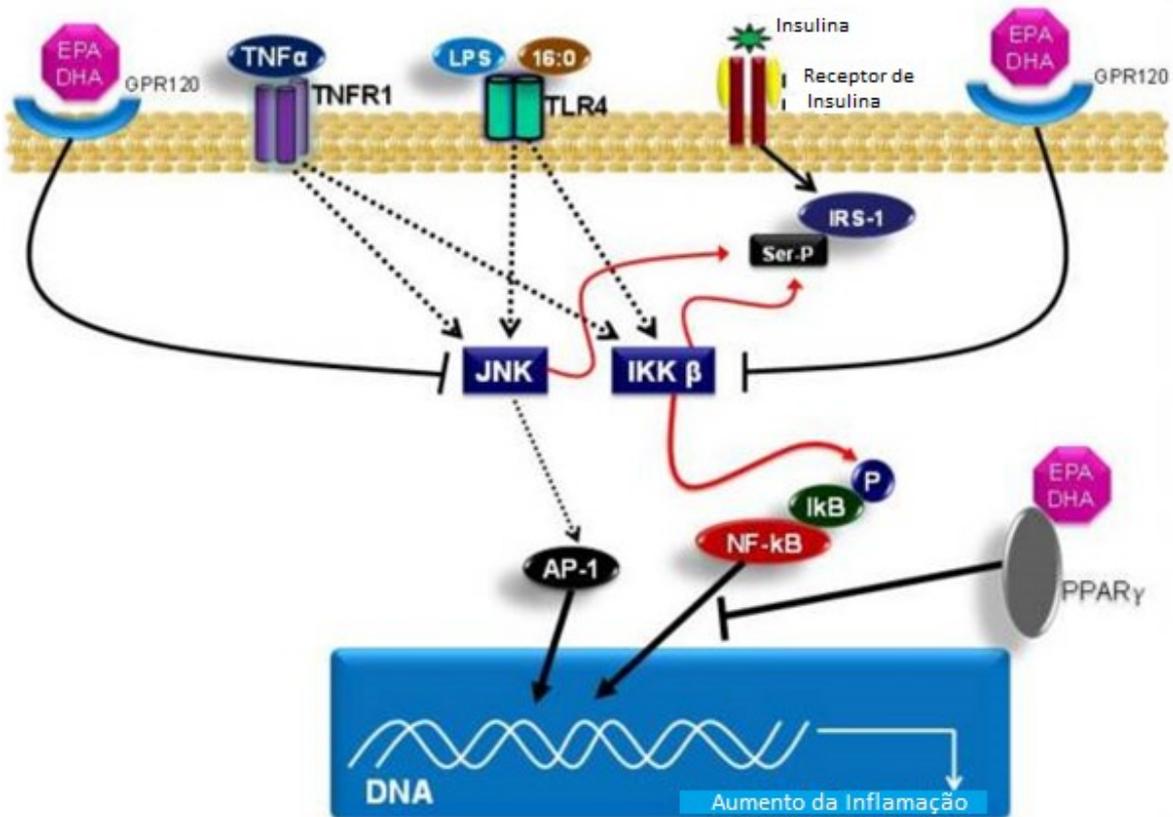


LBP: proteína de ligação a LPS; LPS: lipopolissacarídeos; IRAK: quinase associada a receptor de IL-1; TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; IKK: inibidor do fator nuclear kappa-B quinase; iNOS: óxido nítrico sintase induzível. Fonte: ROGERO; CALDER, (2018)

De forma semelhante ao LPS, ácidos graxos saturados (AGS) também são capazes de estimular diretamente a expressão de genes pró-inflamatórios, como mostra a Figura 7. AGS, particularmente ácido láurico e ácido palmítico, são capazes de estimular uma resposta inflamatória através da via de sinalização TLR4 (HWANG; KIM; LEE, 2016). Lee et al. (2001) publicaram o primeiro estudo que demonstrou o efeito de diferentes ácidos graxos na via de sinalização do TLR4. Neste estudo, verificou-se que os ácidos láurico, palmítico e esteárico poderiam induzir a expressão de COX-2 através de um mecanismo dependente de NF-κB em uma linhagem de macrófagos. Entre os ácidos graxos saturados que foram testados, o ácido láurico teve a maior capacidade de ativação através do TLR4. Ácidos graxos saturados também podem induzir uma resposta inflamatória através da ativação de TLR2, que forma heterodímeros na membrana plasmática, juntamente com TLR1 ou TLR6. Diferentemente dos AGS, os ácidos

monoinsaturados e poli-insaturados não levaram à ativação do sinal do TLR4 (HUANG et al., 2012; ROCHA et al., 2016; SNODGRASS et al., 2013).

Figura 7. Principais mecanismos moleculares relacionados aos efeitos dos ácidos graxos saturados (16:0) e ômega-3 (EPA, DHA) nas vias TLR4 e NF-κB.



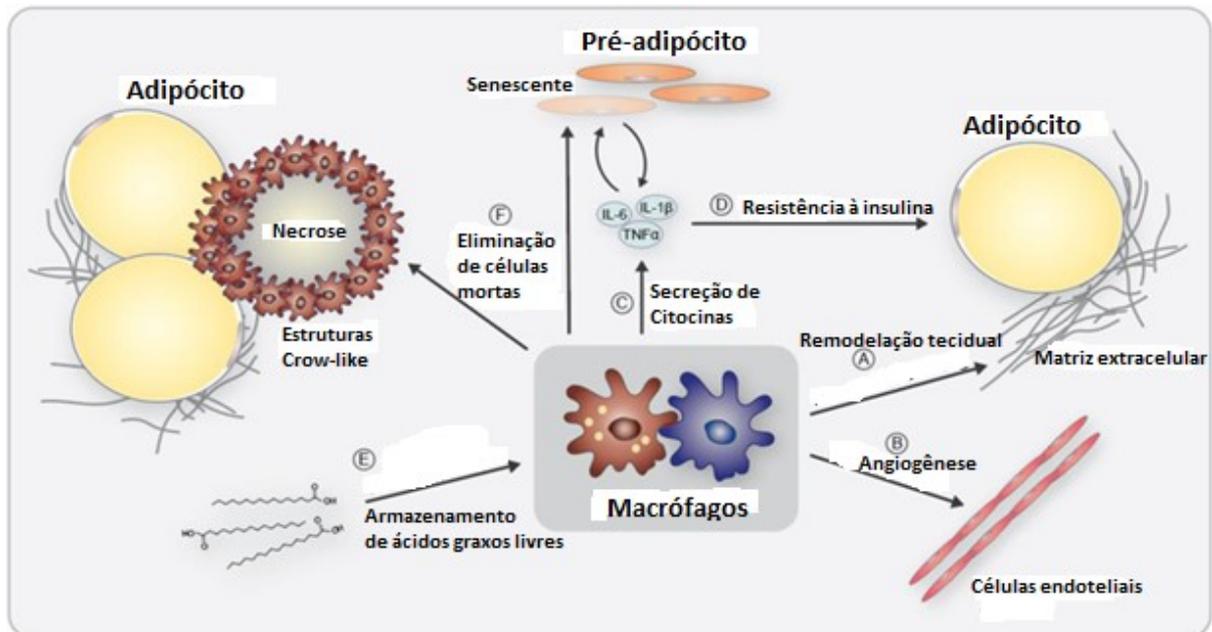
As setas → indicam ativação e as setas ⊥ indicam inibição. Abreviaturas: TNF α , factor de necrose tumoral; TNFR1, receptor do factor de necrose tumoral 1; LPS, lipopolissacáridos; 16:0, ácido palmítico; TLR4, receptor do tipo Toll-like 4; GPR120, receptor acoplado a proteína G 120; EPA, ácido eicosapentaenóico; DHA, ácido docosa-hexaenóico; IRS-1, substrato do receptor de insulina 1; Ser-P, resíduos de *serina* fosforilados; PPAR γ , Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; JNK, c-Jun quinases terminais N; IKK β , quinase do inibidor do fator nuclear kappa-B subunidade beta; I κ B, inibidor de NF-KB; P, fosfato; AP-1, proteína ativadora 1. Fonte: Rogero e Calder (2018).

O tecido adiposo é heterogêneo na sua composição e contém, além de adipócitos maduros, também adipócitos imaturos (pré-adipócitos), células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e outras células do sistema imunológico. Embora a obesidade esteja associada ao desenvolvimento de inflamação crônica de baixo grau do tecido adiposo, as células imunes que se infiltram no tecido adiposo realizam várias funções diferentes que permitem a expansão saudável do tecido

adiposo durante o excesso calórico crônico. Os macrófagos do tecido adiposo são em grande parte derivados da medula óssea e seu número está aumentado na obesidade (WEISBERG et al., 2003). Isso porque a ingestão calórica em excesso sem gasto de energia leva à expansão de tecido adiposo e hipertrofia dos adipócitos, que está associada à hipóxia e apoptose de adipócitos, que por sua vez geram sinais para recrutamento de macrófagos (SURMI; HASTY, 2008) . Adipócitos hipertróficos começam a secretar baixos níveis de TNF- α , que estimulam os pré-adipócitos e células endoteliais a produzir MCP-1 (também conhecida como CCL2) (XU et al., 2003). De fato, no tecido adiposo de camundongos e humanos obesos, os macrófagos infiltrados estão aumentados e se agregam em torno de adipócitos mortos, formando padrões de anéis característicos, denominados crown-like structures (CLS) (CINTI et al., 2005).

O esquema da Figura 8 sumariza as principais funções dos macrófagos no tecido adiposo. Exemplos de funções de macrófagos no tecido adiposo incluem a quebra de proteínas da matriz extracelular à medida que as células se expandem e criam espaço para novos adipócitos, e estabelece nova matriz extracelular, processos que são conhecidos coletivamente como remodelação tecidual (A). Os macrófagos também desempenham um papel crítico na formação de novos vasos sanguíneos à medida que o tecido se expande, isto é, estimulam a angiogênese (B). A ativação de vias inflamatórias em adipócitos e células imunes promovem a liberação de citocinas (C) que desempenham um importante papel na indução de resistência à insulina em adipócitos (D) e, por conseguinte, limita a hipertrofia excessiva dessas células, que é conhecida por desencadear a apoptose (E). Os macrófagos também são capazes de armazenar de forma intermitente o lipídio que pode se tornar importante sempre que a capacidade de armazenamento de lipídios dos adipócitos é, temporariamente restrita. E, por último, os macrófagos desempenham um papel fundamental na remoção de detritos celulares de adipócitos necróticos ou apoptóticos ou células senescentes, formando os CLS (F).

Figura 8. Principais funções dos macrófagos na fisiologia do tecido adiposo



Fonte: BURHANS et al. (2018)

Macrófagos localizados no tecido adiposo podem ser pró ou anti-inflamatórios, dependendo de seu status de ativação (CHINETTI-GBAGUIDI; STAELS, 2011). Macrófagos classicamente ativados (referidos como Macrófagos M1) são considerados pró-inflamatórios. O estado M1 é induzido por, entre outros, $TNF-\alpha$ e LPS. Macrófagos ativados alternativamente (referidos como macrófagos M2), por outro lado, funcionam primariamente para resolver ou amortecer a resposta inflamatória e são, portanto, considerados anti-inflamatórios. O status M2 é induzido por, entre outros, IL-4 e IL-10. Macrófagos presentes no tecido adiposo de obesos parecem ser predominantemente polarizados para o fenótipo M1 e sua presença está associada à resistência à insulina (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; OH et al., 2012). De fato, vários estudos evidenciaram que o estado inflamatório, observado no tecido adiposo durante a obesidade, está fortemente associado a efeitos negativos na sinalização da insulina (LÊ et al., 2011; VAN GREEVENBROEK; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2013).

2.6 RESISTÊNCIA À INSULINA E INFLAMAÇÃO

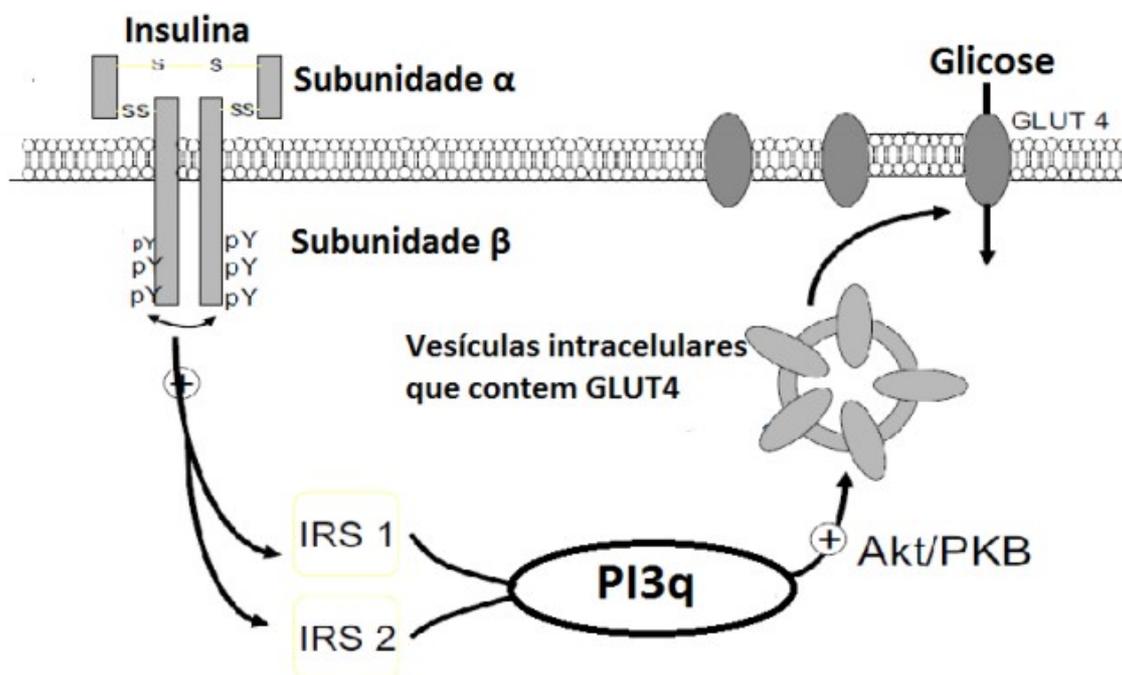
Como já mencionado anteriormente, o excesso de tecido adiposo leva a um estado de inflamação crônica de baixo grau, induzindo o recrutamento de

macrófagos aos adipócitos em resposta à quimiotaxia e assim liberando as citocinas pró-inflamatórias, que são capazes de induzir alterações na via intracelular da insulina (GUO, 2014; SOLINAS; BECATTINI, 2017b). A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células-beta do pâncreas, cujas funções metabólicas incluem captação de glicose, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, redução da produção hepática de glicose, lipólise e proteólise (LIN et al., 2011).

A captação de glicose nos tecidos sensíveis à insulina, em especial músculo esquelético e tecido adiposo, é composta por várias etapas intracelulares (Figura 9). A sinalização intracelular da insulina é iniciada a partir da ligação do hormônio ao seu receptor específico (IR), o qual resulta em sua auto-fosforilação em resíduos de tirosina e consequente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS) (PESSIN; SALTIEL, 2000). A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que então fosforila em serina a proteína quinase B (Akt) e isso permite o transporte de glicose, através da translocação da proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4) para a membrana celular (ROWLAND; FAZAKERLEY; JAMES, 2011). No entanto alguns fatores podem prejudicar a via de sinalização da insulina e assim resultar na diminuição da captação de glicose para o meio intracelular levando ao fenômeno de resistência à insulina (MASHARANI et al., 2011).

A resistência à insulina pode ser definida como uma disfunção metabólica que resulta em prejuízos na translocação de vesículas, que contém GLUT4, para a membrana, diminuindo a capacidade do músculo esquelético, tecido adiposo e outros tecidos sensíveis a insulina de captar glicose para as células levando a um estado hiperglicêmico (CASTRO et al., 2013). Os mecanismos para o desenvolvimento da resistência à insulina relacionados à obesidade são caracterizados por alterações no padrão de fosforilação do IR e IRS. Já foi verificado que o aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios, como AGS, TNF- α e IFN- γ , promovem a fosforilação do IR e IRS em serina resultando em uma diminuição na fosforilação do IRS em tirosina, na atividade da PI3K e no transporte de glicose, e consequentemente induzindo resistência à insulina (NANDIPATI; SUBRAMANIAN; AGRAWAL, 2017; ZHANG et al., 2018).

Figura 9. Via de sinalização da insulina.



Fonte: FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, (2014).

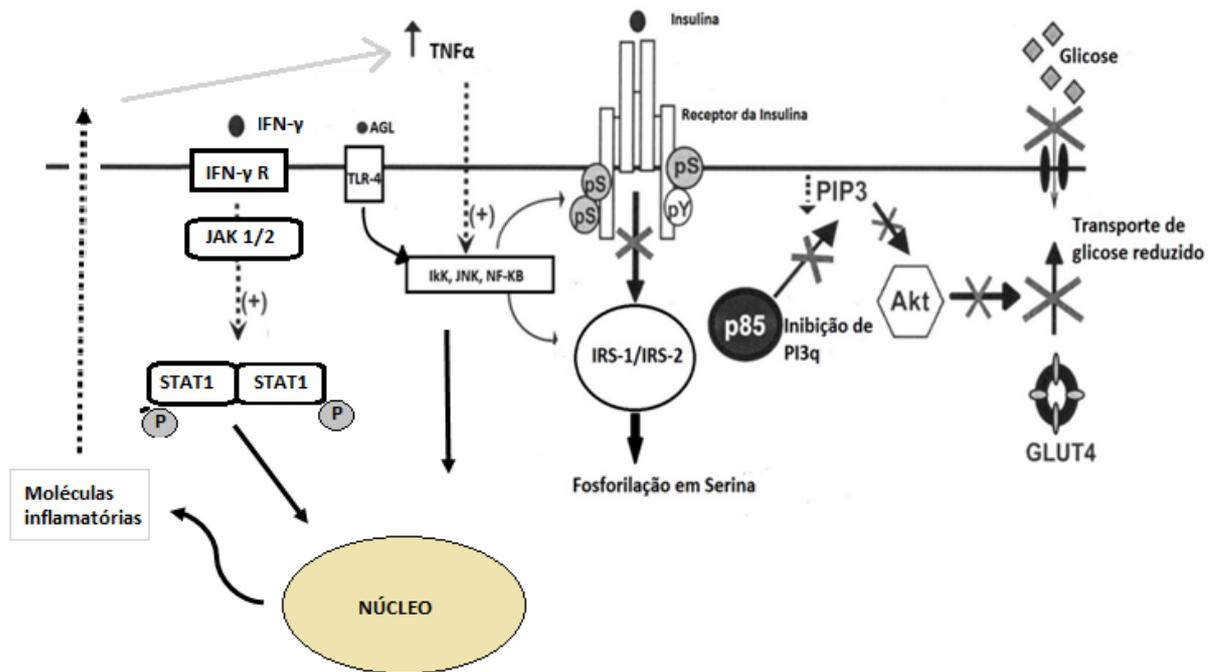
AGS aumentam a expressão de TLR4 e promovem a instalação de um estado inflamatório pelas vias inflamatórias c-jun N-terminal kinase (JNK) e I κ B/NF- κ B (ANDREASEN et al., 2011; NGUYEN et al., 2007). As JNKs são proteínas que pertencem a família MAPK e sua atividade está aumentada em ratos e humanos obesos (HIROSUMI et al., 2002; JIANG; MESSINA, 2011; SOLINAS; BECATTINI, 2017a). As JNKs podem causar resistência à insulina diretamente pela indução da fosforilação de serina e treonina dos IRSs, interrompendo, assim, a interação dos IRSs com IR e prejudicando a sinalização da insulina (SABIO; DAVIS, 2010; SOLINAS et al., 2007). I κ B, também fosforila IRSs em resíduos de serina, atenuando a atividade de tirosinas; e ainda participa da fosforilação de I κ B que permite a translocação do NF- κ B ao DNA nuclear induzindo dessa forma a transcrição gênica de mediadores inflamatórios como TNF α e IL-6 (BARMA et al., 2009). Por outro lado, camundongos *knockout* para TLR4 e alimentados com dieta rica em gordura foram protegidos contra o aumento do tecido adiposo, resistência à insulina e diminuição da expressão de JNK (TSUKUMO et al., 2007). Adicionalmente, animais com supressão de JNK e I κ B induzida por *knockout* ou fármacos apresentaram proteção contra o aumento do tecido adiposo, menor infiltração de macrófagos, menor secreção de adipocinas pró-inflamatórias, diminuição na fosforilação de IRS-1 em

resíduos de serina e assim apresentaram uma melhora na sensibilidade à insulina (JIANG; MESSINA, 2011; ZHANG et al., 2011).

Outro importante candidato molecular conhecido por induzir resistência à insulina associada à obesidade são as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e o INF- γ . O mecanismo pelo qual TNF- α induz resistência à insulina está na ligação dessa citocina aos seus receptores na membrana plasmática TNFR1 e TNFR2 sendo capaz de ativar também as proteínas inflamatórias I κ B e JNK e assim dando sequência na resposta inflamatória causada por estas moléculas (DE ALVARO et al., 2004; FERNÁNDEZ-VELEDO et al., 2009). Estudos em humanos obesos que apresentavam resistência à insulina mostram que um tratamento farmacológico que inibe TNF- α diminui a inflamação sistêmica e conseqüentemente melhora a sensibilidade à insulina (STAGAKIS et al., 2012; STANLEY et al., 2011). O IFN- γ , por sua vez, induz principalmente a fosforilação em tirosina e ativação de STAT1 via JAK1 e JAK2. A fosforilação de STAT1 está aumentada em músculo esquelético de ratos obesos e diminui a sensibilidade à insulina; enquanto o tratamento de ratos obesos com um inibidor JAK1/JAK2 melhora a resistência sistêmica à insulina em conjunto com a redução da inflamação (GRZELKOWSKA-KOWALCZYK; WIETESKA-SKRZECZYŃSKA, 2009; KHAN et al., 2015).

Portanto fica evidente que através de vários mecanismos, incluindo as citocinas inflamatórias e o excesso de AGS observado na obesidade, ocorre a ativação das vias inflamatórias como JNK, I κ B/NF- κ B e JAK/STAT1 que regulam negativamente a sinalização da insulina (Figura 10). Nesse contexto a busca por compostos e agentes naturais que neutralizem o desequilíbrio dos estados pró-inflamatórios pode ser útil para a prevenção e/ou tratamento da resistência à insulina relacionada à obesidade.

Figura 10. Resumo dos possíveis mecanismos de resistência à insulina na obesidade



Fonte: FREITAS; CESCHINI; RAMALLO (2014).

2.7 MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE

A microbiota intestinal humana é uma grande e diversa comunidade de microrganismos que incluem, bactérias, fungos, protozoários e vírus, estimando-se um total de aproximadamente 10 a 100 trilhões de células microbianas (SENDER; FUCHS; MILO, 2016). Apesar de cada indivíduo possuir uma microbiota diferente, o conjunto de genes expressos pelos microrganismos intestinais é funcionalmente o mesmo para a grande maioria dos indivíduos. Com o sequenciamento do gene rRNA 16S mais de 1000 espécies bacterianas foram identificadas, sendo a maioria pertence aos filos Bacteroidetes e Firmicutes (MARIAT et al., 2009).

A formação da microbiota se inicia ao nascimento e o padrão de colonização será diferente de acordo com o modo de nascimento, uma vez que o bebê será exposto primeiro à microbiota vaginal (como *Lactobacillus* e *Prevotella*) da mãe, se for realizado um parto normal, ou à microbiota da pele (como *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*), se for um parto cesariano. O modo como o recém-nascido é alimentado também influencia a composição da microbiota; com a amamentação, observa-se grande quantidade de *Bifidobacterium* e pequena quantidade de *Clostridium* e *Bacteroides*, enquanto na ausência de amamentação observa-se número elevado de *Clostridium* e *Bacteroides*. Durante a infância, a

microbiota será moldada de acordo com eventos como infecções, exposição a antibióticos e, principalmente, alterações na dieta. Com o avançar da idade, ela se estabiliza e apresenta grande diversidade (ALBENBERG; WU, 2014)

Atualmente a microbiota intestinal é considerada um “órgão chave” para manutenção da saúde e bem-estar do hospedeiro. Estudos reportaram inúmeras propriedades funcionais da microbiota intestinal, como a fermentação de polissacarídeos dietéticos indigeríveis; síntese de aminoácidos essenciais, vitaminas e enzimas; produção de peptídeos antimicrobianos como defensinas, lectinas do tipo C, catelicidinas que desempenham um papel ativo no sistema imune inato e adaptativo; e participação no metabolismo de xenobióticos (MOROWITZ; CARLISLE; ALVERDY, 2011; ZONG et al., 2020). O desequilíbrio na composição e funcionamento da microbiota intestinal, conhecido por disbiose, está associado ao desenvolvimento de doenças imunológicas, metabólicas e neurológicas (CRAM et al., 2019; KIECOLT-GLASER et al., 2018; ZENG et al., 2019). A microbiota intestinal é um importante regulador do metabolismo energético do hospedeiro, existindo várias evidências de seu envolvimento na inflamação crônica de baixo grau relacionada à obesidade e suas complicações (SUK; KIM, 2019; TONG et al., 2018).

A dieta alimentar é um importante modulador da microbiota intestinal e alimentos ricos em gorduras saturadas proporcionam um ambiente propício para seleção das bactérias do filo Firmicutes (KIM et al., 2019). Nesse sentido a ingestão de calorias em excesso promove a proliferação dessas bactérias permitindo a extração de nutrientes com maior eficácia, ocasionando ganho de peso e inúmeros distúrbios metabólicos (KIM et al., 2019; SERINO et al., 2012). Por outro lado, a ingestão de fibras, frutas e hortaliças, proporciona o aumento da produção de derivados da fermentação de carboidratos resultando um ambiente desfavorável ao crescimento de Firmicutes (MAKKI et al., 2018). Desta forma, a microbiota intestinal pode se adaptar rapidamente à disponibilidade de um nutriente específico, produzindo diferentes respostas metabólicas no indivíduo.

O interesse científico no papel da microbiota intestinal na obesidade foi atraído pela demonstração do estudo de Bäckhed et. al (2004) que concluíram que camundongos criados na ausência de microrganismos, denominados *germ-free*, tinham menos gordura corporal do que os camundongos colonizados com microbiota convencional, apesar de os ratos terem maior ingestão energética. Notavelmente, quando os camundongos *germ-free* foram colonizados com a microbiota intestinal

convencional, eles ganharam peso e apresentaram níveis aumentados de gordura corporal. Eles também tinham níveis mais altos de glicose e insulina, bem como do hormônio leptina que se correlaciona diretamente com o aumento de gordura corporal (BÄCKHED et al., 2004). Dessa forma, a caracterização do perfil da microbiota intestinal de obesos em comparação a indivíduos magros vem sendo investigado. Estudos experimentais apontam o aumento da relação Firmicutes/Bacteroidetes em camundongos obesos, embora em humanos, essa relação ainda seja controversa (MAGNE et al., 2020; MARIAT et al., 2009). Contudo, fica evidente que as alterações na composição da microbiota de indivíduos obesos, em comparação a magros, implicam no aumento do ganho de peso, da permeabilidade intestinal, endotoxemia e resistência à insulina (EJTAHED et al., 2020; ZENG et al., 2019).

Alterações na composição da microbiota levam a alterações em alguns metabólitos microbianos que podem ser transportados através da barreira intestinal e, eventualmente, biotransformados pelo hospedeiro. Essas alterações envolvem a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), aminoácidos, ácidos nucleicos, intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, carboidratos, e metabólitos oriundos do metabolismo microbiano da colina, como trimetilamina (TMA), metilamina (MA) e dimetilamina (DMA). Um importante metabólito derivado da microbiota intestinal que pode afetar o balanço energético e as mudanças de peso em humanos e animais são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), em especial acetato, propionato e butirato. Esses AGCCs são produzidos por meio da fermentação bacteriana de carboidratos não digeríveis oriundos da dieta. AGCCs fornecem energia aos colonócitos, e seu aumento nas concentrações plasmáticas atenua a inflamação, melhora a sensibilidade à insulina e regula a saciedade (BOUTER et al., 2018; CANFORA et al., 2017; SAHURI-ARISOYLU et al., 2016). Contudo análises de amostras fecais têm demonstrado aumento de AGCCs em indivíduos obesos em comparação a indivíduos magros (KIM; YAO; JU, 2019; SCHWIERTZ et al., 2010). de la Cuesta-Zuluaga et al. (2018) foram os primeiros a mostrar uma correlação positiva entre altos níveis fecais de AGCCs e aumento de permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica na obesidade (DE LA CUESTA-ZULUAGA et al., 2018).

O etanol é um metabólito microbiano derivado da fermentação sacarolítica. Indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e obesidade

mostram aumento da abundância de bactérias produtoras de etanol nas fezes, bem como maiores concentrações de etanol na circulação sistêmica e na respiração (NAIR et al., 2001; ZHU et al., 2013, 2016). O etanol derivado de bactérias intestinais (ou o metabólito oxidado acetaldeído) está possivelmente envolvido na progressão da DHGNA por efeitos tóxicos diretos nas células hepáticas (BAKER et al., 2010; XU et al., 2011), bem como através do comprometimento na função da barreira intestinal, resultando em aumento da endotoxemia (RAO; SETH; SHETH, 2004).

A microbiota intestinal utiliza vários aminoácidos de proteínas dietéticas ou endógenas na síntese de produtos metabólicos que podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade a distúrbios metabólicos afetando a biodisponibilidade de aminoácidos para o hospedeiro. Alguns tipos de aminoácidos, incluindo aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) - valina, leucina e isoleucina – e aminoácidos aromáticos (AAAs) - fenilalanina, tirosina e triptofano - foram relatados como um fator de risco para distúrbios metabólicos, incluindo obesidade, resistência à insulina, DMT2 e DHGNA (BLOOMGARDEN, 2018; HAUFE et al., 2016; HEIANZA et al., 2019). Em indivíduos obesos foi evidenciado aumento nos níveis séricos de AAAs, glutamato e BCAAs (ALLAM-NDOUL et al., 2015; LIU et al., 2017). Esses estudos apontam que a microbiota intestinal dos indivíduos obesos pode ter uma maior capacidade de produção destes aminoácidos em comparação com controles magros.

Abordagens metabolômicas identificaram que o N-óxido de trimetilamina (TMAO), um metabólito derivado da colina e L-carnitina, é um fator de risco para distúrbios metabólicos (CHEN et al., 2016; DING et al., 2018; TAN et al., 2019). A geração de TMAO depende da microbiota intestinal, que primeiro metaboliza a colina dietética em TMA. A TMA é absorvida no intestino, entrando na circulação sanguínea e seguindo para o fígado, onde será oxidada por enzimas hepáticas flavinas mono-oxidases (FMO) em TMAO. Esta última pode ser liberada pelo fígado e ser absorvida pelos tecidos extra-hepáticos ou ser excretada pela urina, pelo suor ou pela respiração. É também absorvida pelos macrófagos no processo de formação da placa aterosclerótica e assim elevados níveis de TMAO estão associados a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. As dietas ricas em gordura aumentam a proporção relativa de Firmicutes, que contribuem para a produção de TMA, e diminuem a de Bacteroidetes, que contribui muito pouco para a produção de

TMA. Estudos em animais e humanos mostraram aumento plasmático de TMAO em indivíduos obesos e relacionaram esse aumento à intolerância à glicose, DHGNA e resistência à insulina (AHMAD et al., 2017).

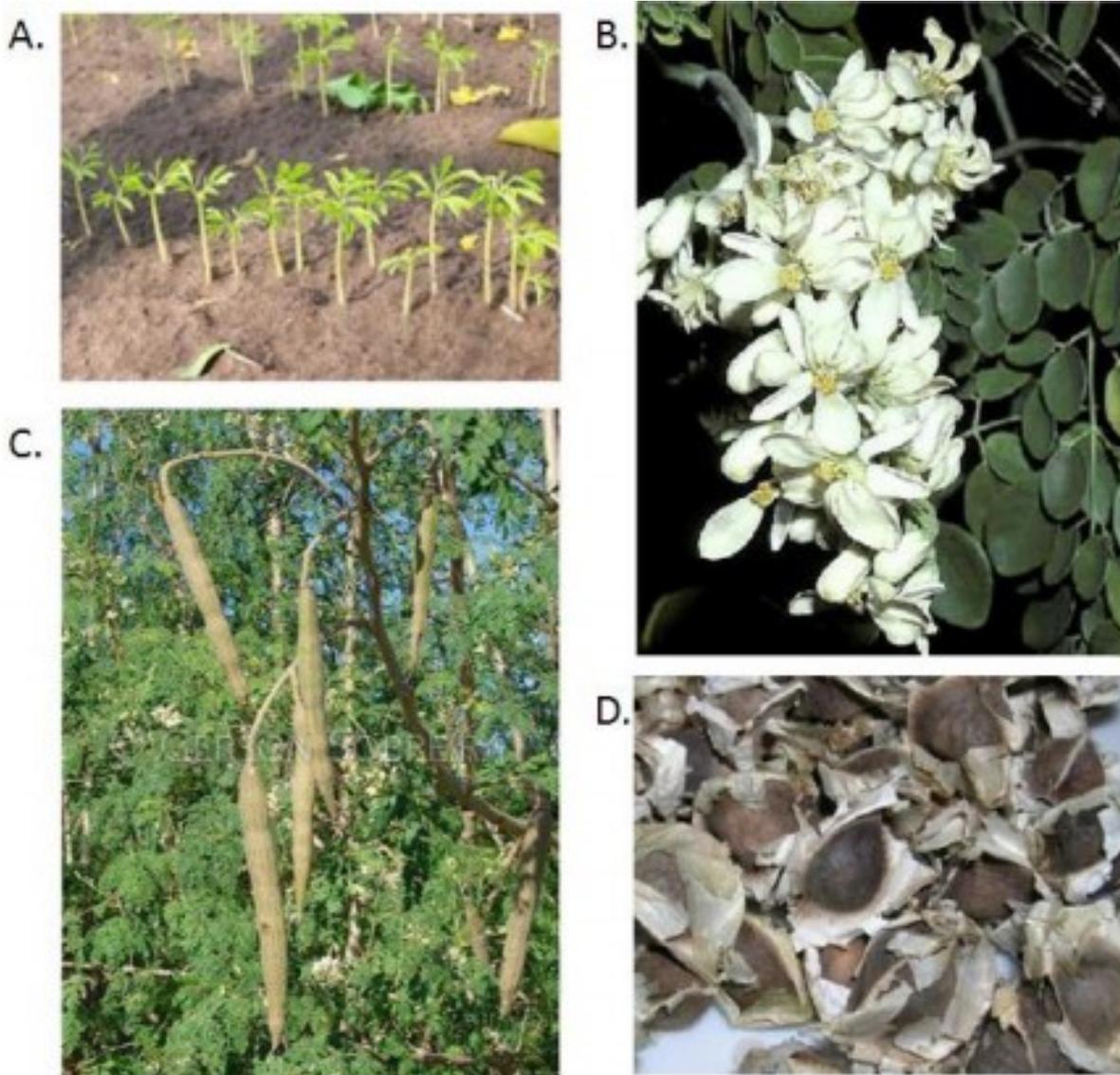
Apesar do exposto, os mecanismos que relacionam a microbiota intestinal e seus produtos metabólicos à obesidade são complexos. Embora ainda existam dúvidas sobre qual o perfil de microrganismos e como os metabólitos microbianos se relacionam à obesidade, muito se conhece sobre sua influência na saúde do hospedeiro. O que se sabe até o momento é que a microbiota intestinal pode afetar o balanço energético influenciando a eficiência energética dos nutrientes da dieta ou atuando como modulador de rotas que regulam o gasto energético. Assim, o conhecimento da microbiota intestinal e de suas vias de regulação do metabolismo humano pode ajudar na identificação de novos alvos terapêuticos para obesidade.

2.8 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lam. é uma árvore de pequeno porte nativa do Himalaia, norte da Índia, pertencente à família Moringaceae. É encontrada principalmente no Oriente Médio e em países africanos e asiáticos, mas devido à sua adaptabilidade, vem se espalhando para outras áreas, especialmente as tropicais e subtropicais (OLSON; FAHEY, 2011). A planta apresenta folhas grandes, flores brancas e perfumadas e frutos longos que contém sementes aladas (Figura 11).

Todas as partes *M. oleifera* (folhas, sementes, raízes e flores) são utilizadas para consumo humano e animal. As folhas, ricas em proteínas, minerais, β -caroteno e compostos antioxidantes, são usadas não apenas para nutrição, mas também na medicina tradicional (MEIRELES et al., 2020). Estudos experimentais demonstraram propriedades antitumoral, antioxidante, hepatoprotetora, cicatrizante, anti-inflamatória e hipoglicemiante com o uso de folhas de *M. oleifera* (CHIN et al., 2018; OMODANISI; ABOUA; OGUNTIBEJU, 2017; SADEK et al., 2017) .

Figura 11. Aspectos gerais de *Moringa oleifera*. A – Caule de *M. oleifera* recém plantadas, B – Folha e Flor, C – Fruto, D - Semente



Fonte: GUALBERTO; FERRARI, 2014

As sementes de *M. oleifera*, por sua vez, apresentam, além de uma grande quantidade de gorduras, um alto teor de proteína, em média 31,4%, enquanto os teores de carboidratos, fibras e cinzas são de 18,4%, 7,3% e 6,2%, respectivamente (tabela 1). As sementes vêm atraindo interesse científico, já que contêm uma quantidade significativa de óleo (até 40%) que é promissor tanto para consumo humano quanto para fins comerciais (A M HASSAN et al., 2018; PEREIRA et al.,

2016). Além disso as sementes vêm sendo usadas no tratamento de água para consumo humano (SÁNCHEZ-MARTÍN; BELTRÁN-HEREDIA; PERES, 2012).

Tabela 1. Composição química das sementes de *M. oleifera* (g/100g de peso seco).

Nutrientes	Sementes de <i>Moringa oleifera</i>		
	Média	SD	Variação
Gordura	36.7	2.8	(34.7-40.4)
Proteínas	31.4	1.3	(29.4-33.3)
Carboidratos	18.4	1.4	(16.5-19.8)
Fibra	7.3	0.5	(6.8-8.0)
Cinza	6.2	0.9	(4.4-6.9)
Umidade	7.0	1.2	(5.7-8.9)

Fonte: LEONE et al., 2016.

Estudos com foco nas propriedades farmacológicas das preparações obtidas de suas sementes vêm sendo realizados. Em ratos Wistar alimentados com o pó das sementes de *M. oleifera* (750 mg/kg/dia, por 4 semanas) observou-se um efeito protetor contra a disfunção do endotélio vascular relacionada ao envelhecimento (RANDRIAMBOAVONJY et al., 2019). Além disso, a administração do pó de sementes de *M. oleifera* pode melhorar a nefropatia diabética e restaurar a histologia normal do rim e do pâncreas em modelo de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (AL-MALKI; EL RABEY, 2015). Extrato aquoso, extrato etanólico e frações obtidas de sementes de *M. oleifera* inibiram significativamente o crescimento de células de câncer de mama e não apresentaram citotoxicidade para células normais (ADEBAYO; ARSAD; SAMIAN, 2017). Em outro estudo, a administração oral de extrato hidroalcoólico de sementes de *M. oleifera* em três doses crescentes (50, 100 e 200 mg/kg) promoveu efeito anti-inflamatório em modelos de ratos com colite aguda induzida por ácido acético (MINAIYAN et al., 2014). Extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* administrados tanto por via oral como por via intraperitoneal mostrou um efeito hipoglicemiante nos ratos hiperglicêmicos induzidos por aloxana (AJIBOLA; EUNICE; STEPHANIE, 2014a). Araújo et al. 2013 também utilizando extrato aquoso de sementes demonstrou que não houve toxicidade sistêmica em

camundongos. Nesse mesmo estudo verificaram a sua atividade anti-inflamatória em um modelo de pleurisia, com uma redução significativa na migração de leucócitos, na atividade das mieloperoxidases e nos níveis de TNF- α e IL-1 β .

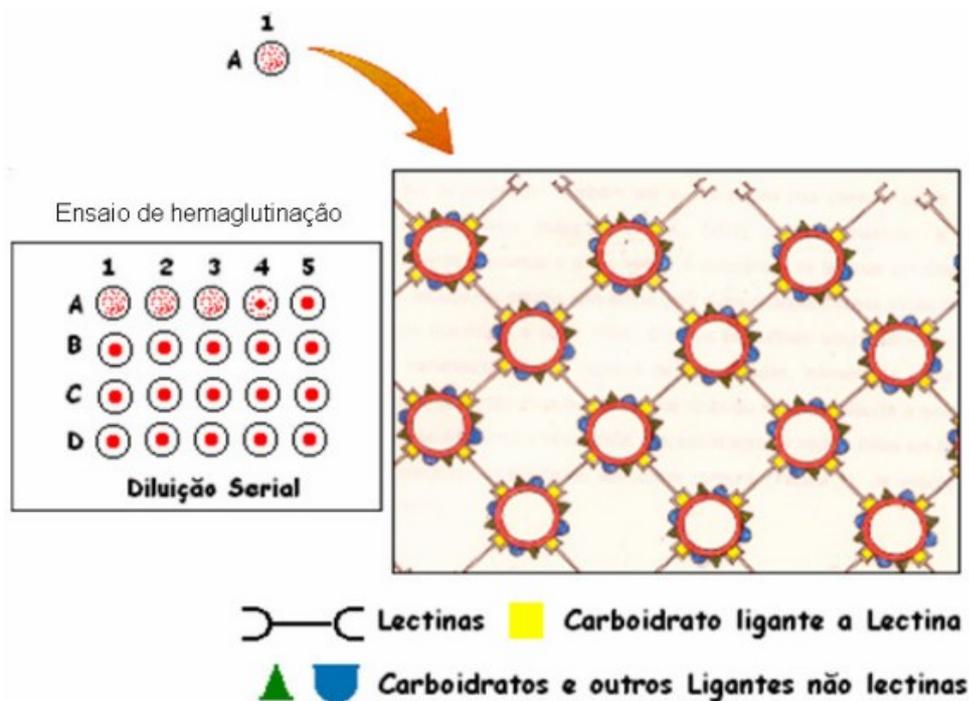
As sementes de *M. oleifera* possuem propriedades coagulantes efetivas no processo de purificação da água para consumo humano, sendo sua utilização frequente há décadas nas zonas rurais do nordeste brasileiro (GERDES, 1997). Foi verificado que a lectina solúvel em água isolada do extrato aquoso de sementes de *M. oleifera*, denominada WSMoL, é um dos componentes responsáveis pela capacidade dessas sementes em reduzir a turbidez da água (FREITAS et al., 2016).

2.9 LECTINAS

As lectinas são proteínas de origem não imune que possuem sítios de ligação a carboidratos capazes de interagir reversivelmente e especificamente com açúcares através de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (COELHO et al., 2017). As lectinas possuem a propriedade de aglutinar eritrócitos que podem ser de humanos ou de animais (ELGAVISH; SHAANAN, 1997; KENNEDY et al., 1995a; NAPOLEÃO et al., 2013). Atividade hemaglutinante (AH) é o ensaio mais comumente utilizado para confirmação da presença de lectinas em uma amostra, sendo sua presença confirmada através da formação de uma rede entre os eritrócitos, fenômeno denominado de hemaglutinação (Figura 12).

Lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, vegetais, bactérias, fungos e algas. (ABREU et al., 2018; KENNEDY et al., 1995b; MISHRA et al., 2019). Em plantas, as lectinas já foram isoladas de diferentes tecidos, tais como: cerne, folhas, flores, sementes, cascas, raízes e rizomas (CARVALHO et al., 2015; CHOLAK et al., 2016; COSTA et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2017; SOUZA et al., 2011).

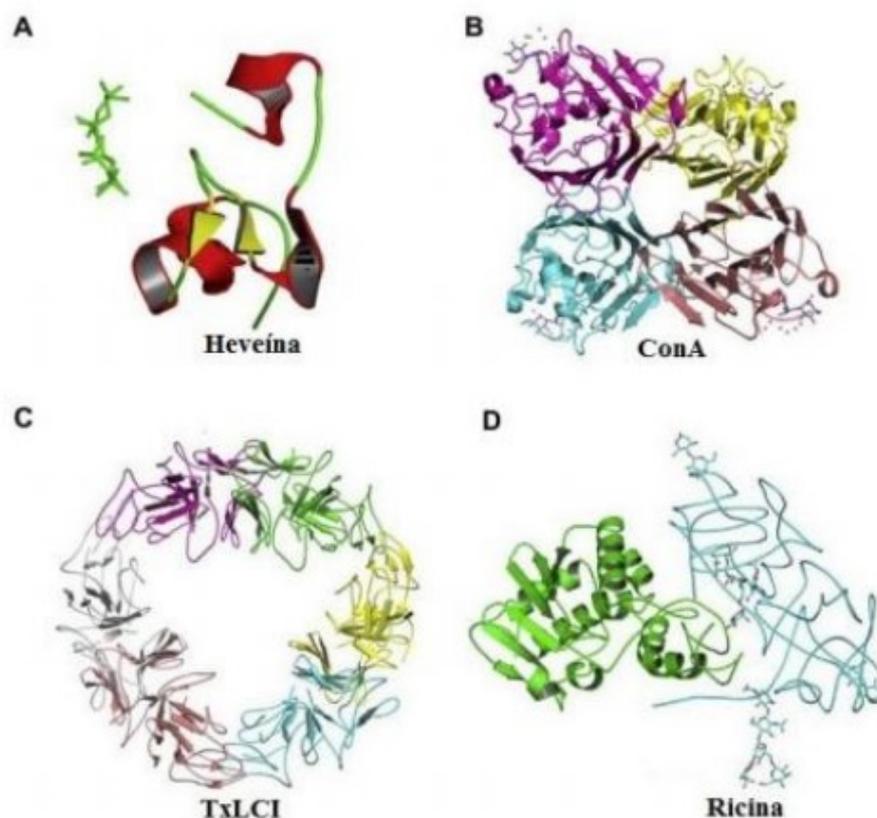
Figura 12. Esquema ilustrativo do processo de hemaglutinação mediado por lectinas



Fonte: (KENNEDY et al., 1995b)

Ao longo dos anos, centenas de lectinas vegetais foram purificadas e caracterizadas com detalhes em relação às suas propriedades bioquímicas, especificidades de ligação a carboidratos e funções biológicas (GODULA et al., 2018). De acordo com a sua estrutura global, as lectinas podem ser classificadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 13). As merolectinas são lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidratos. As hololectinas tem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos idênticos. As quimerolectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio ligante a carboidrato, e um outro domínio com uma atividade catalítica ou uma outra atividade biológica. Já as superlectinas são lectinas que possuem dois ou mais domínios de ligação a carboidratos, domínios esses com especificidade para açúcares diferentes. As lectinas vegetais também foram classificadas de acordo com sua especificidade em monoespecíficas e poliespecíficas, ou seja, que podem interagir com um ou mais açúcares (BARRE et al., 2001; VIJAYAN; CHANDRA, 1999).

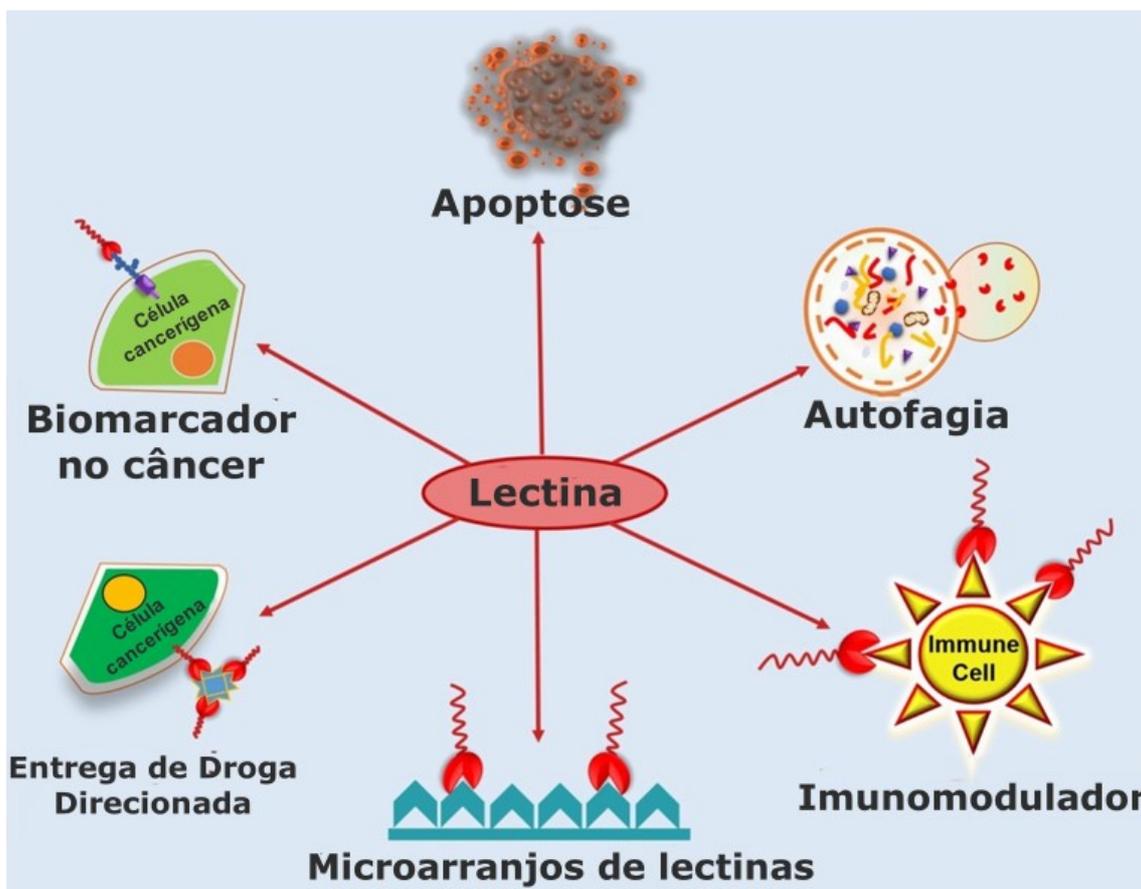
Figura 13. Representação ilustrativa da estrutura de lectinas quanto ao domínio de ligação a carboidrato. (A) Merolectinas; (B) Hololectinas; (C) Superlectinas; (D) Quimerolectinas



Fonte: Adaptado de LIU; BIAN; BAO (2010).

Com relação à atividade biológica, as lectinas podem ter ação em vários processos biológicos, apresentando efeitos antitumorais, por inibição de metástases, ação na angiogênese e morte celular por autofagia, necrose e/ou apoptose; atividades imunomoduladora, antifúngica, antibacterianas e inseticida (ARAÚJO et al., 2013a; BHUTIA et al., 2019a; CORIOLANO et al., 2018; LIU; BIAN; BAO, 2010; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; MOURA et al., 2015; SANTOS et al., 2005). Além disso, lectinas vegetais também têm sido usadas na área biomédica para diagnóstico, como por exemplo para distinguir células malignas de um tumor benigno com base no grau e padrão de glicosilação (MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020). Lectinas de plantas também vêm sendo utilizadas para desenvolver *microarrays*, a fim de reconhecer as células tumorais malignas tanto para o diagnóstico como prognóstico do câncer (MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; RILLAHAN; PAULSON, 2011). Devido sua especificidade de ligação a carboidratos de superfície celular, lectinas também podem ser usadas para direcionar a entrega de fármacos em células-alvo (MARTÍNEZ-CARMONA et al., 2018). A Figura 14 resume algumas propriedades biológicas e aplicações das lectinas de plantas.

Figura 14. Propriedades biológicas e aplicações de lectinas de plantas.



*Fonte: BHUTIA et al., (2019b).

Vários estudos relatam a ação antimicrobiana de lectinas de plantas contra espécies de fungos e bactérias patogênicas (BREITENBACH BARROSO COELHO et al., 2018; DA SILVA et al., 2018; EL-ARABY et al., 2020; PROCÓPIO et al., 2017). As bactérias possuem em suas paredes celulares ácidos teicoicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, aos quais as lectinas podem interagir levando à perda de integridade da parede e/ou membrana celular e promovendo morte ou inibição do crescimento bacteriano. PgTeL, uma lectina isolada da sarcotesta das sementes de *Punica granatum* (romã), apresentou atividade antibacteriana contra isolados clínicos de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina. A lectina causou alterações na morfologia celular como alongamento, enrugamento, perfurações, aumento no tamanho e lise celular, apresentou efeito anti-agregação e exibiu atividade antibiofilme contra ambos os isolados de *S. aureus* (DA SILVA et al., 2019). Além disso, PgTeL se mostrou um importante agente anti-*Candida* cujo

mecanismo de ação envolve estresse oxidativo, colapso energético, danos à parede celular e ruptura de células de levedura (DA SILVA et al., 2018).

O potencial farmacológico das lectinas é bastantes amplo e atividades anti-inflamatória e imunomoduladora já foram reportadas. São exemplos, a lectina extraída da *Caulerpa cupressoides* que reduziu a migração de leucócitos em um modelo murino de inflamação; e a lectina da *Synadenium carinatum* que reduziu o número de células inflamatórias recrutadas para o pulmão em um modelo murino de asma, através da inibição da via NF- κ B (ROGERIO et al., 2007; VANDERLEI et al., 2010). A lectina WSMoL também apresentou efeitos anti-inflamatórios em macrófagos estimulados por LPS, reduzindo a produção de citocinas e NO (ARAÚJO et al., 2013a). Dessa forma, fica evidente que o papel das lectinas na modulação da secreção de citocinas, óxido nítrico e na diferenciação de linfócitos pode ser uma importante ferramenta para auxiliar no combate de doenças infecciosas e inflamatórias.

2.10 WSMoL

A lectina WSMoL é uma proteína aniônica com massa molecular de 60 kDa composta por arranjos oligoméricos com subunidades de 5 kDa sendo ativa em uma ampla faixa de pH (4,5 a 9,5) e mesmo quando aquecida (100°C) durante 5 horas (ROLIM et al., 2011; MOURA et al., 2016). WSMoL foi detectada pela primeira vez em extratos aquosos de sementes de *M. oleifera* por Santos et al. (2005). E seu protocolo de isolamento através da cromatografia de coluna de quitina foi realizado posteriormente por Coelho et al. (2009). Essa lectina reconhece D(+)-frutose e N-acetilglicosamina, uma vez que a presença desses carboidratos inibiu a AH (ROLIM et al., 2011).

WSMoL apresenta atividade coagulante responsável pela redução da turbidez da água (FREITAS et al., 2016). Além disso, é relatada como agente inseticida contra *Anagasta kuehniella* e *Aedes aegypti* (ALVES et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2014) e antimicrobiano, já que mostrou efeitos inibitórios no crescimento, sobrevivência e permeabilidade celular de diversas espécies de bactérias e fungos patogênicos (CORIOLANO et al., 2020; FERREIRA et al., 2011b; MOURA et al., 2015, 2017; SANTOS et al., 2020). WSMoL também apresentou atividade anti-helmíntica, uma vez que inibiu a eclosão de ovos e interferiu no

desenvolvimento larval e na motilidade de vermes adultos de nematódeos que causam infecção gastrointestinal em ruminantes (MEDEIROS et al., 2018; MEDEIROS et al., 2020). Seus efeitos anti-inflamatório e imunomodulador também foram avaliados *in vitro*. WSMoL exibiu atividade anti-inflamatória em macrófagos de murinos estimulados por LPS, regulando a produção de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β (ARAÚJO et al., 2013b). Em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), WSMoL induziu a liberação de TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10, NO e levou à ativação de linfócitos TCD8+, demonstrando seu potencial imunomodulador (CORIOLANO et al., 2018).

WSMoL não apresentou propriedades genotóxicas de acordo com os testes de Ames, Kado e DNA plasmidial e nem citotóxicas em PBMCs, garantindo seu uso seguro em modelos experimentais *in vivo* (ARAÚJO et al., 2013a; ROLIM et al., 2011). Um estudo recente avaliou a segurança do uso *in vivo* de WSMoL e mostrou que a administração oral por 21 dias em camundongos não causou alterações nas funções cardíacas e metabólicas de animais saudáveis (YURRE et al., 2020).

3 MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DE PREPARAÇÕES DE SEMENTES DE *M. oleifera*.

As sementes de *M. oleifera* foram coletadas na cidade do Recife (PE). O pó das sementes (10g) foi extraído em água destilada (100 mL) em agitador magnético por 16h a 28°C. Após filtração em gaze e centrifugação (3000g, 15 min), o sobrenadante coletado correspondeu ao extrato aquoso 10% (EXT). A fração proteica foi obtida após precipitação (4h a 28°C) das proteínas do extrato aquoso 10% utilizando sulfato de amônio (60% de saturação). A fração precipitada (FR60) foi coletada, ressuspendida em NaCl 0,15 M e dialisada (em membrana de 3,5 kDa) contra NaCl 0,15 M (6h a 4 °C). WSMoL foi isolada por cromatografia da FR60 em coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com NaCl 0,15 M (fluxo de 0,3 mL/min). Depois de exaustivas lavagens com a solução de equilíbrio, WSMoL foi eluída da coluna com ácido acético 1,0 M e dialisada contra NaCl 0,15 M (6h a 4 °C). A eluição da proteína foi seguida por absorvância a 280 nm e a concentração de proteína de todas as preparações foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovino como padrão. A detecção de atividade de WSMoL foi realizada através do ensaio de atividade hemaglutinante em placa de microtitulação de acordo com o método descrito por Paiva e Coelho (1992).

3.2 ESTIRPES BACTERIANAS, CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.

Foram utilizadas as seguintes estirpes bacterianas:

1. *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02 e 8325-4 (isolados susceptíveis);
Staphylococcus aureus UFPEDA-670, -671, 672 e CA-MRSA LAC USA300 (isolados resistentes à metilina);
2. *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA-833;
3. *Escherichia coli* UFPEDA-224

Os isolados bacterianos: *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA-833; *S. aureus* UFPEDA-02, -670, -671 e -672 e *Escherichia coli* UFPEDA-224 foram obtidos da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade

Federal de Pernambuco (UFPE). Já os isolados: *S. aureus* 8325-4 (NCTC 8325, NOVICK, 1967) e CA-MRSA LAC USA300 (FPR3757, DIEP et al., 2006) foram obtidos na Universidade de Copenhague, Dinamarca. As culturas-estoque foram mantidas em leite desnatado em pó estéril contendo 10% (v/v) de glicerol ou meio de cultura caldo Muller Hinton (MH) contendo 30% (v/v) de glicerol (-80°C). Para realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio MH-ágar overnight a 36°C e, posteriormente, as colônias foram ressuspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,15M) e ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (DO600) para a obtenção de suspensão equivalente a 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC) por ml. Para o ensaio, as amostras foram filtradas em filtro de seringa PVDF 13 mm x 0,22 µm estéreis. Foram utilizadas concentrações iniciais do EXT à 2,995 mg/ml; da FR60 à 2,253 mg/ml e da WSMoL à 2,8 mg/ml. A faixa de concentração no ensaio foi de 1,2-0,02 mg/ml para o EXT; 0,9-0,01 mg/ml para a FR60 e 1,1-0,02 mg/ml para WSMoL.

3.3 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

A concentração mínima inibitória (CMI) das amostras foram determinadas pelo ensaio de microtitulação em placas de 96 poços. Adicionou-se 80 µL da amostra no quarto poço, a partir do qual dilui-se em série, com água destilada estéril, até o décimo segundo poço da mesma fileira. Posteriormente, 40 µl do meio caldo MH foi adicionado em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 µl do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. Antibióticos (8 µg/ml) foram usados como controle positivo no segundo poço. Finalmente, a suspensão bacteriana (80 µl; 10⁶ UFC/ml) foi acrescentada no segundo poço até o último poço da fileira. O terceiro poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 37°C e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. O CMI100 e CMI50 correspondeu a menor concentração da amostra capaz de promover a redução de 100% e ≥50%, respectivamente, na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%. Para a determinação do CMB, alíquotas (10 µl) dos

poços contendo concentrações das amostras \geq CMI50 foram inoculados em placas de petri contendo meio MH ágar, que foram posteriormente incubados a 37 °C por 24h. O CMB correspondeu a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inoculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

3.4 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados camundongos Swiss machos com 8 semanas de idade e peso médio de 35 g. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno sob condições ambientais padrões (24 ± 1 ° C, umidade 45-65% e ciclo claro/escuro de 12 h) e receberam comida e água ad libitum. Todos os animais foram tratados em conformidade com padrões éticos estabelecidos pelo Conselho Internacional de Ciência Animal de Laboratório (ICLAS) e os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA – UFPE nº 0042/2017).

3.5 INDUÇÃO DE SEPSE E TRATAMENTO

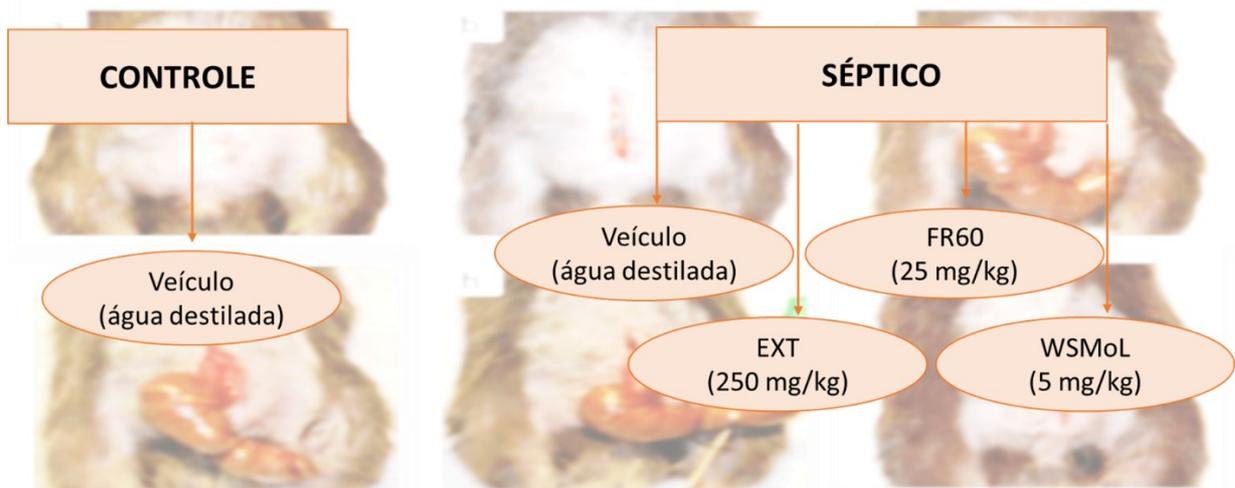
A indução experimental da sepse foi realizada utilizando o modelo de cirurgia de ligadura e punção cecal (CLP), como descrita anteriormente (). A sepse induzida por CLP consiste em uma infecção polimicrobiana endógena, promovida por meio de perfuração do ceco, que permite vazamento de bactérias intestinais na cavidade intraperitoneal, gerando peritonite e levando a sepse. O modelo CLP em camundongos é o mais comumente utilizado para estudar o processo de peritonite séptica e pode ser usado como modelo pré-clínico para testar a eficácia de agentes farmacológicos para o tratamento da sepse.

Antes da cirurgia, todos os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) e sob condições assépticas, uma incisão de 1 a 2 cm foi feita no abdômen inferior esquerdo e o ceco foi exposto. A porção distal do ceco foi ligada com fios de suturas de seda e perfurada com uma agulha de calibre 21. Após a perfuração, para permitir

o vazamento de uma pequena quantidade de conteúdo fecal, o ceco foi suavemente comprimido e então retornado para a cavidade peritoneal e a incisão foi fechada com fios de sutura. Os camundongos do grupo controle foram submetidos a uma laparotomia similar sem ligadura ou punção. Para reposição de fluidos, solução salina isotônica (37 °C, -4% do peso corporal) foi administrada por via subcutânea, imediatamente após o procedimento cirúrgico. Então, todos os animais foram devolvidos a suas gaiolas, com livre acesso a comida e água.

Após 3 h da indução da sepse, os camundongos foram randomizados em 5 grupos: 1) Controle que recebeu o veículo (água destilada), 2) Séptico que recebeu o veículo, 3) Séptico que recebeu EXT (250 mg/kg), 4) Séptico que recebeu FR60 (25 mg/kg) e séptico que recebeu WSMoL (5 mg/kg). Todos os tratamentos foram realizados em dose única através de gavagem. Os camundongos foram observados a cada 12 h durante 3 dias consecutivos.

Figura 15. Desenho experimental no modelo de Sepse.



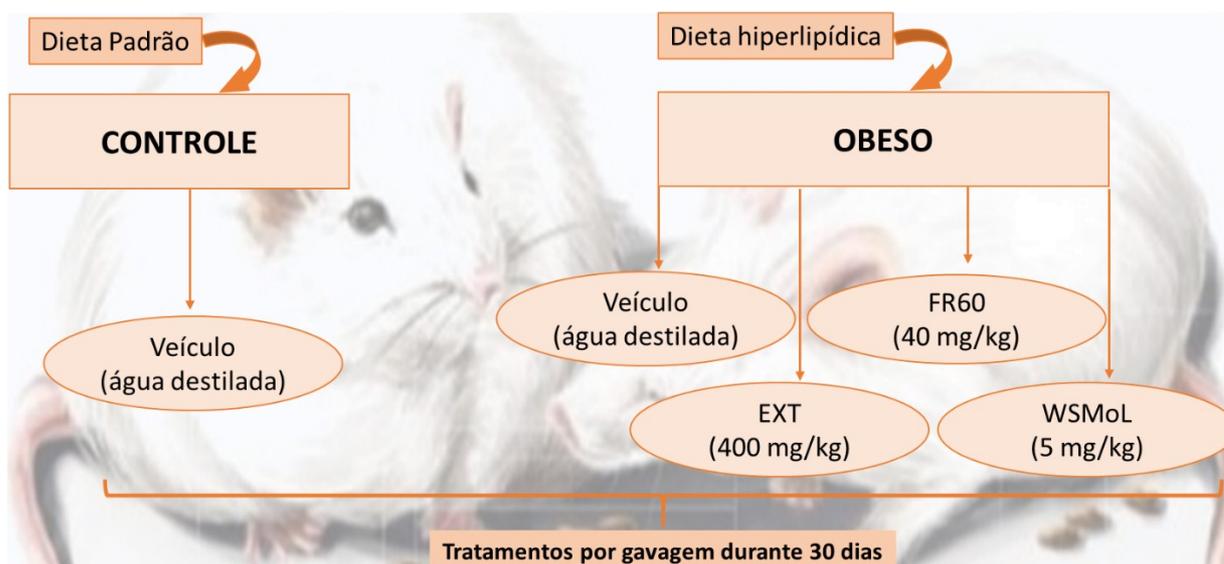
Fonte: o autor (2021)

3.6 INDUÇÃO DE OBESIDADE E TRATAMENTO

Obesidade e resistência à insulina foram induzidas com dieta rica em gordura por 8 semanas (55% da energia derivada da gordura, 29% dos carboidratos e 16% das proteínas) enquanto os animais do grupo controle, receberam ração padrão para roedores pelo mesmo período (8% de gordura, 26% de proteína, 54% de carboidratos, como uma porcentagem do total de kcal). Após 8 semanas da indução

de obesidade, os animais obesos (OB) e aqueles do grupo controle (C) receberam por gavagem o tratamento com EXT (400 mg/kg), FR60 (40 mg/kg), WSMoL (5 mg/Kg) ou água destilada (veículo) durante 30 dias. Os animais foram divididos em 5 grupos de acordo com a dieta e tratamento: grupo controle (C), grupo obeso (OB), grupo obeso tratado com EXT (OB-EXT), grupo obeso tratado com FR60 (OB-FR60), grupo obeso tratado com WSMoL (OB-WSMoL), como detalhado na Figura 10.

Figura 16. Desenho experimental no modelo de obesidade.



Fonte: o autor (2021)

3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Após 8 h de jejum os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT). Inicialmente foi obtida a glicemia de jejum dos animais avaliados. Logo após, insulina (1,5 U/Kg) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda dos animais nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min para a determinação da glicemia, utilizando glicosímetro FreeStyle Optium H (Abbott). A velocidade constante do decremento da glicose (KITT) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

3.8 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Os camundongos foram submetidos a 8 h de jejum para realização do teste de tolerância à glicose (GTT). Os camundongos receberam injeção intraperitoneal de uma solução de glicose (1 g/Kg) e a glicemia foi medida antes da injeção e após 15, 30, 60, 90 e 120 min a partir de amostras de sangue coletados da veia da cauda de cada camundongo, utilizando glicosímetro FreeStyle Optium H (Abbott).

3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS

A partir do sangue coletado da veia cava, os níveis séricos das citocinas TNF- α ; INF- γ ; IL-6; IL-2; IL-4; IL-17; IL-10 foram dosadas em soro dos camundongos em jejum utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) da Becton Dickinson-BD. Esse sistema emprega uma mistura de seis esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas, e são detectadas no canal FL-3. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra. Inicialmente as amostras de soro dos camundongos mantidas a -80°C foram descongeladas e alíquotas de $25\mu\text{L}$ do soro teste com diluente G, alíquotas de $25\mu\text{L}$ dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (reagente presente no kit CBA) ("Top Standart") e $25\mu\text{L}$ de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon no 2052). Em seguida, a cada tubo foi adicionado $15\mu\text{L}$ da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ e IL-17 (Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit) com subsequente incubação por 90 minutos em temperatura ambiente (T.A), ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com $500\mu\text{L}$ da solução F ("Wash buffer", reagente presente no kit CBA), centrifugadas a $600 \times g$, por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então re-incubadas na presença de $20\mu\text{L}$ do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas (ou anti-quimiocinas) de rato, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, T.A., ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com $500\mu\text{L}$ da solução F, centrifugadas a $600 \times g$, por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em $250 \mu\text{L}$ de reagente F e imediatamente analisadas

no citômetro de fluxo Modelo Accuri C6 System (BD Accuri™ C6). A análise do perfil de citocinas foi feita segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do BD CBA Analyses Software.

3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Fragmentos de tecido adiposo epididimal e fígado foram extraídos, pesados e imediatamente fixados em formaldeído a 10% por 24h. Posteriormente, os fragmentos de tecidos foram desidratados em soluções de concentração crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), imersos em xilol e, então, incluídos em parafina. Em seguida, os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 5 µm com o auxílio de um micrótomo e corados pelo método Hematoxilina- Eosina (H&E).

3.11 PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE AMOSTRAS FECAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Após 30 dias de tratamento, amostras fecais foram coletadas direto do intestino grosso dos camundongos e pelo menos 3 pelotas de fezes foram coletadas de cada camundongo, transferidas para os tubos eppendorf de 1,5 mL e imediatamente congeladas a -80°C. Para obtenção de águas fecais foram utilizados 1200 µL de tampão fosfato (pH=7,0 ~ 7,4) em 50 mg do material fecal. Após completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 15min a 14000rpm e 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C.

Para realização da RMN, alíquotas de 1,5 mL foram centrifugadas a 14000 rpm (ST 40 R, SORVALL – Thermo Scientific) por 15 min e em seguida, 500 µL de cada sobrenadante foram transferidos individualmente para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. Às amostras foi adicionado 200 µL de uma solução tampão (tampão fosfato de sódio, 100% de D2O, pH = 7,4 e 1 mM de TSP (padrão de deslocamento)). Todo experimento de RMN foi realizado em espectrômetro Bruker AVANCE III 600 MHz equipado com sonda PABBO de 5 mm a 300K. Todos os espectros de RMN-1H foram realizados utilizando-se da sequência de pulsos noesypr1d para supressão do sinal de ressonância da água por pré-saturação. Para todos os experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros: NS: 64 (número de experimentos); DS: 4

(número de experimentos falsos); D1: 4,00 s (tempo de relaxação); D8: 0,09 s (tempo de mistura); TD: 64K (número de pontos do espectro); SW: 20,0290 ppm (largura da janela); O1P: 4,69 ppm (posição onde aparece o sinal referente a água e, portanto, é irradiada); AQ: 2,72 s (tempo de aquisição); P1: 90° (ângulo do pulso)

Os espectros foram pré-processados no software TopSpin® 4.0.7, onde foram realizados correção de fase e calibração do deslocamento químico com referência no TSP ($\delta = 0$ ppm). Para identificação dos metabólitos utilizou-se do software Chenomx® e do banco de dados disponível na plataforma online www.hmdb.ca. A matriz de dados foi preparada utilizando-se do software MatLab®, onde todos os espectros foram sobrepostos, alinhados, cortados e normalizados, por fim os dados foram transportados para o Excel® formando uma matriz de dados contendo aproximadamente 24 mil variáveis. Para a análise estatística multivariada utilizou-se do software Simca® e da plataforma online www.metaboanalyst.ca.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, seguida de pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla de médias. Os resultados que apresentaram um nível de significância menor que 0,05 foram considerados significantes. A diferença geral na taxa de sobrevivência foi determinada pelo teste de Kaplan-Meier, seguido de um teste de log-rank.

4 RESULTADOS

Os resultados da presente tese serão apresentados em formato de artigos.

4.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITOS NO CONTROLE GLICÊMICO E PERFIL INFLAMATÓRIO DE EXTRATO, FRAÇÃO PROTEICA E LECTINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* EM CAMUNDONGOS SÉPTICOS

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Biochimie”



Fator de impacto: 3.413

Atividade antibacteriana e efeitos no controle glicêmico e perfil inflamatório de extrato, fração proteica e lectina de sementes de *Moringa oleifera* em camundongos sépticos

Marília Kalinne da Silva Torres^a, Jailton Lobo da Costa Lima^d, Pollyanna M. Silva, Maiara C. Moura^a, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Ana Maria Rampeloti Almeida^b, Yasmim Alinne de Araújo Castro^b, Vitória Camilo^a, Stefani da Silva Mendes da Silva^b, Amanda Mota Vieira^b, Milena Damasceno de Souza Costa^b, Patrícia Luana Barbosa da Silva Ribeiro^a; Jonathan Nicolás dos Santos Ribeiro^a, Hanne Ingmer^c, Luana C. B. B. Coelho^a, Thiago H. Napoleão^a, Bruno de Melo Carvalho^b, Patrícia M. G. Paiva^a

a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

b Laboratório de Imunometabolismo, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

c University of Copenhagen, Department of Veterinary Disease Biology, Copenhagen, Dinamarca

d Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

***Corresponding author.** Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

RESUMO

A sepse, um distúrbio complexo caracterizado por uma resposta inflamatória desregulada a uma infecção, afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Devido a resistência microbiana aos antibióticos, o risco de letalidade por sepse cresce de forma alarmante. Somada a isso a disglucemia e resposta inflamatória exacerbada durante a hospitalização por sepse confere maior risco de disfunção orgânica e morte, fazendo-se necessário a busca por novos alvos terapêuticos. O objetivo do presente estudo foi avaliar extrato (EXT), fração proteica (FR60) e lectina WSMoL obtidos de sementes de *Moringa oleifera* quanto a atividade antibacteriana in vitro contra bactérias envolvidas na sepse e determinar o efeito das preparações no controle glicêmico e perfil inflamatório em camundongos sépticos. A análise da atividade antibacteriana foi realizada através da determinação das concentrações mínima inibitória e mínima bactericida. A sepse foi induzida em camundongos Swiss através do modelo de ligação e punção cecal (CLP) e após 3 h da indução da sepse, os camundongos receberam única dose oral do veículo (água destilada) ou das preparações de *M. oleifera*. A glicemia de jejum e o teste de tolerância a Insulina foram realizados após 24 h da indução da sepse e a análise de sobrevivência dos animais sépticos foi realizada a cada 12 h durante 3 dias. EXT, FR60 e WSMoL apresentaram atividade bacteriostática contra MRSA e *Escherichia coli* com CMI variando entre 0,03 e 1,10 mg/mL. Camundongos sépticos apresentaram hipoglicemia e resistência à insulina e os tratamentos com EXT e WSMoL não reverteram esse quadro. Por outro lado, o tratamento com F60R normalizou os níveis glicêmicos, melhorou a sensibilidade à insulina e reduziu os níveis de TNF, IL-2 e IL-6. O estudo revelou que as preparações de *M. oleifera* são agentes antibacterianos contra importantes espécies envolvidas na sepse e mostrou que FR60 é capaz de restabelecer o perfil glicêmico e melhorar a sensibilidade à insulina por reduzir o quadro inflamatório em camundongos sépticos.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, sementes, glicemia, sepse, antibacteriano

1. Introdução

A sepse, síndrome clínica resultante da desregulação de respostas imunológicas e metabólicas frente à infecção, afeta mais de 48 milhões de indivíduos por ano em todo o mundo (1,2). Apesar dos esforços durante as últimas décadas, estima-se que 11 milhões de mortes aconteçam por sepse no mundo, o que a torna um importante problema de saúde pública (2).

Clinicamente, quase 95% dos casos de sepse são causadas por infecção bacteriana. Os patógenos etiológicos mais comuns são as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negativo*) seguido de Gram-negativos, em especial a *Escherichia coli* (3). Bactérias resistentes aos antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), são frequentemente detectadas em pacientes sépticos com aquisição de infecção hospitalar (4). O aumento das taxas de resistência antibacteriana reforça a necessidade urgente de opções terapêuticas inovadoras (5).

O estresse fisiológico da sepse resulta em desregulação no metabolismo da glicose (6) e a hiperglicemia é comum em pacientes com sepse, com e sem diabetes (7–9). Os glicocorticoides liberados na resposta fisiológica ao estresse contribuem para o aumento dos níveis glicêmicos por estimularem a gliconeogênese e a glicogenólise (19). Adicionalmente, o aumento exacerbado de citocinas pró-inflamatórias contribuem para o desenvolvimento da resistência periférica à insulina e hiperglicemia na sepse, inibindo a expressão e a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) no músculo esquelético e no tecido adiposo uma vez que prejudica a sinalização pelas vias do receptor do substrato da insulina do tipo 1 (IRS-1) e proteína quinase B (AKT) (10,11). Os efeitos agudos das citocinas pró-inflamatórias na liberação de insulina pancreática não são claros, com alguns estudos demonstrando aumento da secreção de insulina e outros demonstrando supressão (12–15). Independentemente disso, a exposição prolongada a citocinas é prejudicial e desencadeia apoptose nas células β pancreáticas (16–18).

A disglucemia na sepse não inclui apenas hiperglicemia. Estudos experimentais em roedores mostraram que durante a evolução da sepse há o desenvolvimento de um estado de hipoglicemia (20,21). Em humanos, a hipoglicemia é um preditor independente de aumento da mortalidade intra-hospitalar em pacientes com sepse grave e geralmente ocorre secundária à administração

exógena de insulina (22,23). Foi demonstrado que a hipoglicemia aguda em indivíduos saudáveis aumenta o estresse oxidativo, a agregação plaquetária, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão da molécula de adesão vascular (24,25). Nesse sentido, novas estratégias terapêuticas se fazem necessárias para alcançar a euglicemia em pacientes com sepse, uma vez que a variabilidade glicêmica está associada a maior mortalidade hospitalar (26).

Moringa oleifera é uma planta cultivada em diversas regiões tropicais de todo o mundo que contém grande variedade de propriedades nutricionais e medicinais (27–29). As sementes de *M. oleifera* contém a lectina (proteína hemaglutinante que liga carboidrato) WSMoL que inibe o crescimento, a sobrevivência e altera a permeabilidade celular de bactérias (30,31). Estudos também demonstraram que WSMoL e o extrato das sementes apresentaram efeitos anti-inflamatório e imunomodulador (32,33) e o extrato também foi capaz de restabelecer os níveis normoglicêmicos em modelo in vivo de diabetes tipo I (34,35).

Diante do exposto, o presente estudo avaliou a atividade antibacteriana in vitro do extrato (EXT), fração proteica (FR60) e WSMoL contra bactérias envolvidas na sepse e determinou o efeito dessas preparações sobre o controle glicêmico e perfil inflamatório em camundongos sépticos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produção do extrato, fração proteica e WSMoL a partir de sementes de *M. oleifera*

As sementes de *M. oleifera* foram coletadas na cidade do Recife (PE) com autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente do Brasil para coleta de plantas (número 38690-1). O pó das sementes (10 g) foi misturado em água destilada (100 mL) em agitador magnético por 16 h a 28 °C. Após filtração em gaze e centrifugação (3000g, 15 min), o sobrenadante coletado correspondeu ao extrato 10% (EXT). A fração proteica (FR60) foi obtida após precipitação (4 h a 28 °C) das proteínas do EXT utilizando sulfato de amônio (60% w/v) e diálise (membrana de 3,5 kDa) contra NaCl 0,15 M (6 h a 4 °C). WSMoL foi isolada por cromatografia da FR60 em coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com NaCl 0,15 M (fluxo de 0,3 mL/min) e eluição da proteína adsorvida com ácido acético 1,0 M (36). A concentração de proteína de todas as

preparações foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando curva padrão de albumina de soro bovino (31-500 µg/mL). A detecção de lectina foi realizada através do ensaio de atividade hemaglutinante em placa de microtitulação utilizando-se eritrócitos de coelho (aprovado pelo comitê de ética sob o nº 23076.033782/2015-70) de acordo com Paiva e Coelho (1992) e a atividade hemaglutinante específica correspondeu ao título dividido pela concentração de proteína (mg/mL)

2.2. Análise da FR60 por cromatografia em camada delgada

FR60 (1 mg) liofilizada e ressuspensa em metanol (1 mL) e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação (15 min a 28 °C) com a fase móvel (Quadro 1). As amostras foram aplicadas com uma distância de 0,5 cm entre elas e das bordas das placas cromatográficas (tamanho da largura e do comprimento de 5 cm). Após a eluição das placas, elas foram secas a 28 °C, observadas sob 365 nm e luz visível e em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Quadro 1). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Quadro 1 - Sistemas, reveladores e padrões utilizados.

Classe de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Taninos Hidrolisáveis	90:5:5	FeCl ₃	Ác. Gálico
Taninos condensados		VC	Catequina
Flavonoides		AlCl ₃	Rutina
Derivados Cinâmicos			Ác. Clorogênico
Terpenos e Esteroides	70:30	LB + Δ	β-Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	LB + Δ	Escina
Quinonas	50:6,75:5	HNO ₃ + KOH 10%	Senosídeo A
Alcaloides	50:6,75:5	Dragendorff	Atropina

Sistemas: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 – Tolueno: acetato; 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 – Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:6,75:5 – Acetato de etila: metanol: água

2.3. Estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02 (isolado susceptível), UFPEDA-670, -671 e 672 (isolados resistentes à meticilina), *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA-833 e *Escherichia coli* UFPEDA-224 foram provenientes da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). *Staphylococcus aureus* 8325-4 (NCTC 8325, NOVICK, 1967, isolado susceptível) e CA-MRSA LAC USA300 (FPR3757, DIEP et al., 2006, isolado resistente à meticilina) foram provenientes da Universidade de Copenhagen. As culturas-estoque foram mantidas em leite desnatado em pó estéril contendo 10% (v/v) de glicerol ou meio de cultura caldo Muller Hinton (MH) contendo 30% (v/v) de glicerol (-80 °C). Para realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio MH-ágar overnight a 36 °C e, posteriormente, as colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,15M) e ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm para a obtenção de suspensão equivalente a 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

2.4. Determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)

As preparações de sementes de *M. oleifera* foram filtradas em filtro de seringa PVDF (13 mm x 0,22 µm) estéreis e a faixa de concentração utilizada no ensaio do EXT, FR60 e WSMoL foi de 0,02–1,2 mg/mL, 0,01–0,9 mg/mL e 0,02–1,1 mg/mL, respectivamente. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada pelo ensaio de microtitulação em placas de 96 poços. Ao quarto poço foram adicionados 80 µL da amostra e diluição em série foi realizada, com água destilada estéril, até o décimo segundo poço da mesma fileira. Posteriormente, caldo MH (40 µL) foi adicionado em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 µL do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. Antibióticos (8 µg/mL) foram usados como controle positivo no segundo poço. Finalmente, a suspensão bacteriana (80 µL; 10⁶ UFC/mL) foi acrescentada no segundo poço até o último poço da fileira. O terceiro poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 37 °C e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. A CMI correspondeu a menor concentração da amostra

capaz de promover a redução $\geq 50\%$, respectivamente, na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%. Para a determinação da CMB, alíquotas (10 μL) dos poços contendo concentrações das amostras $\geq \text{CMI}$ foram inoculados em placas de petri contendo meio MH ágar, que foram posteriormente incubados a 37 °C por 24 h. A CMB correspondeu a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

2.5. Animais e Aspectos Éticos

Nesse estudo foram utilizados camundongos Swiss machos (8 semanas de idade, 35g). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno sob condições padrões ambientais (24 ± 1 ° C, umidade 45-65% e ciclo claro / escuro de 12 h) e receberam comida e água ad libitum. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Internacional de Ciência Animal de Laboratório (ICLAS) e os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório (SBCAL). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (número 0042/2017).

2.6. Indução de sepse e tratamento

A indução da sepse experimental foi realizada através do modelo de ligadura e punção cecal (CLP). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e sob condições estéreis, uma incisão de 1 a 2 cm foi feita no abdômen inferior esquerdo e o ceco foi exposto. A porção distal do ceco foi ligada com fios de suturas de seda de 3 mm e perfurada com uma agulha de calibre 21. Após a perfuração, para permitir o vazamento de uma pequena quantidade de conteúdo fecal, o ceco foi suavemente comprimido e então retornado para a cavidade peritoneal e a incisão foi fechada com fios de sutura. Os camundongos do grupo controle foram submetidos a uma laparotomia similar sem ligadura ou punção. Para reposição de fluidos, solução salina isotônica (37 °C, -4% do peso corporal) foi administrada por via subcutânea, imediatamente após o procedimento cirúrgico. Então, todos os animais foram devolvidos a suas gaiolas, com livre acesso a comida e água. Após 3 h da indução da sepse, os camundongos foram randomizados em 5 grupos: 1) Controle que

recebeu o veículo (água destilada), 2) Séptico que recebeu o veículo, 3) Séptico que recebeu EXT (250 mg/kg), 4) Séptico que recebeu FR60 (25 mg/kg) e séptico que recebeu WSMoL (5 mg/kg). Todos os tratamentos foram realizados em dose única através de gavagem. Os camundongos foram observados a cada 12 h durante 3 dias consecutivos.

2.7. Teste de tolerância à insulina

Após 24 h da indução da sepse os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT). A glicemia foi mensurada após 8 h de jejum e em seguida, insulina (1,5 U/Kg) foi injetada intraperitonealmente. Amostras de sangue foram coletadas pela cauda dos animais nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min para a determinação da glicemia, utilizando glicosímetro FreeStyle Optium H (Abbott). A velocidade constante do decremento da glicose (KITT) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

2.8. Dosagem de citocinas

Após 24 h da indução da sepse, o sangue foi coletado da veia cava dos camundongos em jejum e processado para obtenção do soro. Os níveis séricos das citocinas TNF- α ; INF- γ ; IL-6; IL-2; IL-4; IL-17A; IL-10 foram dosados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) da Becton Dickinson-BD. As amostras de soro foram processadas de acordo com indicações do Kit e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo Modelo Accuri C6 System (BD Accuri™ C6). A análise do perfil de citocinas foi feita segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do BD CBA Analyses Software.

2.9. Análise Estatística

Os dados são exibidos como média \pm erro padrão da média (SEM). Múltiplas comparações foram testadas por ANOVA one-way, seguido pelo teste post hoc de Bonferonni, com nível de significância estabelecido em $P < 0,05$, usando o software GraphPad Prism (La Jolla, CA, EUA). A diferença global na taxa de sobrevivência foi determinada pelo teste de Kaplan-Meier seguido por um teste log-rank.

3. Resultados

3.1. EXT, FR60 e WSMoL são agentes antibacterianos contra espécies envolvidas em sepse

A atividade antibacteriana do EXT (atividade hemaglutinante específica de 59,7), FR60 (atividade hemaglutinante específica de 1.896) e WSMoL (atividade hemaglutinante específica de 2.327) foi testada *in vitro* frente a espécies associadas ao quadro de sepse. A Tabela 1 mostra que as três preparações foram apenas agentes bacteriostáticos contra *E. coli*, sendo o EXT a mais eficiente (CMI de 0,04 mg/mL) e que todas foram bacteriostáticas e bactericidas contra *S. saprophyticus* sendo os menores valores de CMI (0,01 mg/mL) e CMB (0,22 mg/mL) determinados para FR60. A avaliação da atividade antibacteriana do EXT, FR60 e WSMoL contra *S. aureus* revelou o efeito bacteriostático contra todos os isolados testados, sendo a menor CMI (0,03 mg/mL) determinada para FR60 contra *S. aureus* 8325 (susceptível a meticilina) e MRSA. O estudo também definiu que o EXT foi o agente bactericida mais eficiente desde que CMB variando de 0,15 a 1,2 mg/mL foram determinadas para todos os isolados, enquanto FR60 e WSMoL não afetaram a sobrevivência de alguns ou apresentaram valores de CMB de 0,9 e 1,12 mg/mL, respectivamente.

Tabela 1. Determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)

Bactérias	EXT			FR60			WSMoL		
	CMI ₁₀₀	CMI ₅₀	CMB	CMI ₁₀₀	CMI ₅₀	CMB	CMI ₁₀₀	CMI ₅₀	CMB
<i>E. coli</i> UFPEDA-224	0,07	0,04	ND	0,4	0,10	ND	1,10	0,30	ND
<i>S. saprophyticus</i> UFPEDA-833	0,30	0,02	0,30	0,22	0,01	0,22	0,30	0,07	0,30
<i>S. aureus</i> UFPEDA-02	1,20	0,30	1,20	ND	0,45	ND	ND	ND	ND
8325-4	0,15	0,04	0,15	0,90	0,03	0,90	1,12	0,07	1,12
MRSA UFPEDA-670	0,30	0,30	0,30	0,90	0,03	0,90	1,12	0,14	1,12
UFPEDA-671	1,20	0,30	1,20	ND	0,11	ND	ND	1,12	ND
UFPEDA-672	0,60	0,60	0,60	ND	0,11	ND	1,12	1,12	1,12
	0,60	0,60	0,60	0,90	0,11	0,90	1,12	0,30	1,12

ND: atividade não detectada. Concentrações expressas em mg/mL. *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02 e 8325-4 (isolados susceptíveis) e *Staphylococcus aureus* UFPEDA-670, -671, 672 e CA-MRSA LAC USA300 (isolados resistentes à meticilina)

3.2. FR60 de *M. oleifera* evitou hipoglicemia e melhorou a sensibilidade à insulina em camundongos sépticos

A figura 1A mostra a glicemia de jejum dos animais após 24 h da indução da sepse. A glicemia de jejum dos animais do grupo séptico não tratado foi menor que os animais do grupo controle enquanto aqueles do grupo séptico tratado com FR60 (25 mg/mL) apresentaram aumento significativo na glicose sérica, retornando aos níveis glicêmicos observados no grupo controle. O EXT e WSMoL não foram capazes de reverter significativamente a hipoglicemia desencadeada pela sepse. A determinação do ITT (Figura 1B) revelou que a KITT estava reduzida no grupo séptico quando comparada ao grupo controle e que FR60 foi a única preparação capaz de reverter a resistência à insulina induzida pelo estado séptico.

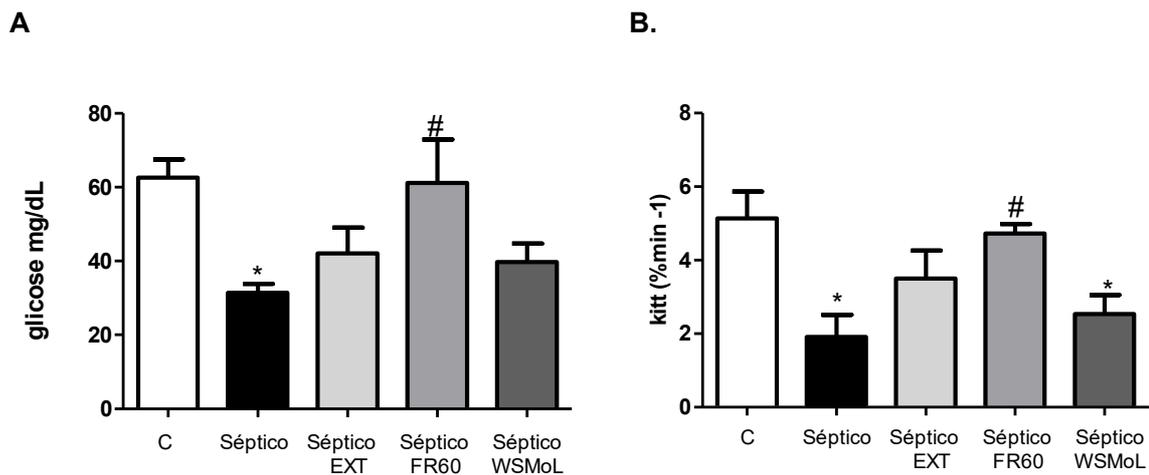


Figura 1. Glicemia de jejum 24 horas após a indução da sepse (A) e teste de tolerância à insulina (B). A análise estatística foi realizada usando ANOVA one way seguida pelo pós-teste de Bonferroni. A significância estatística é indicada por * ou # $P < 0,05$ (* diferente do controle e # diferente do séptico).

3.4. FR60 de *M. oleifera* atenua inflamação em camundongos sépticos

A figura 2 mostra os níveis séricos de citocinas nos animais dos grupos controle, séptico e séptico tratado com FR. Camundongos sépticos apresentaram níveis de TNF- α , IL-6 e IL-2 significativamente maiores que os camundongos do grupo controle. O tratamento com FR promoveu uma diminuição significativa nos níveis circulantes dessas citocinas inflamatórias, retornando aos níveis séricos

observados no grupo controle. Os níveis de INF, IL-4, IL-10 e IL-17 foram similares em todos os grupos experimentais.

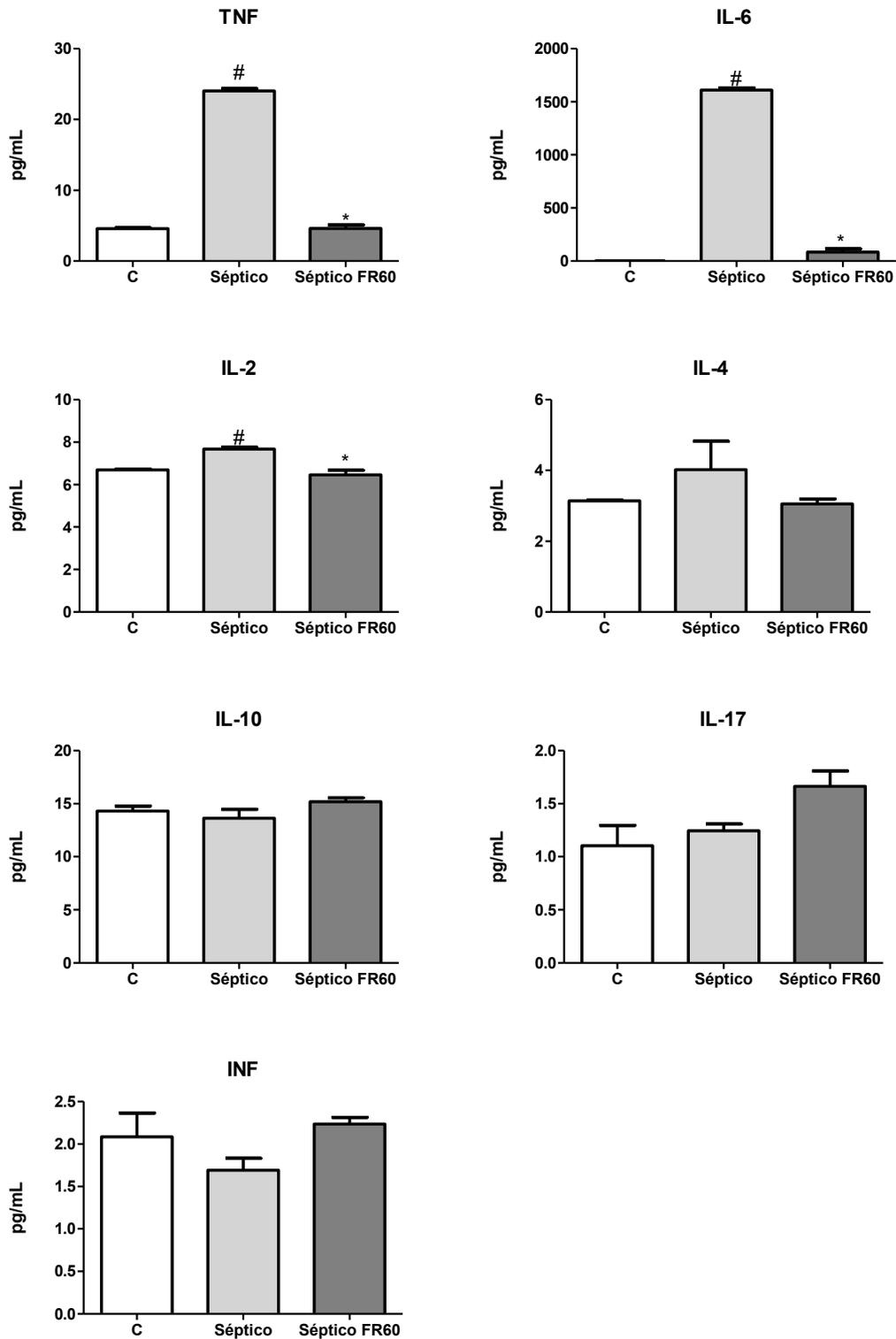


Figura 2. Níveis séricos de citocinas no controle (C), Séptico e Séptico tratado com fração protéica (Séptico FR60). Os dados são média \pm DP ($n = 3$). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-

way, seguida do pós-teste de Bonferroni. A significância estatística é indicada por * OR # P <0,05 (* diferente do controle e # diferente do séptico).

3.5. Efeito da FR60 da semente de *M. oleifera* na sobrevida de camundongos sépticos.

Após 1 dia da indução da sepse, foi detectada sobrevivência de 83,33% dos camundongos no grupo séptico tratado com FR em comparação a 66,66% do grupo séptico não tratado. Ao final do 3^a dia da indução da sepse não houve diferença significativa na taxa de sobrevida entre os grupos sépticos tratados com FR e não tratados, 50% e 66,66%, respectivamente (Fig. 3).

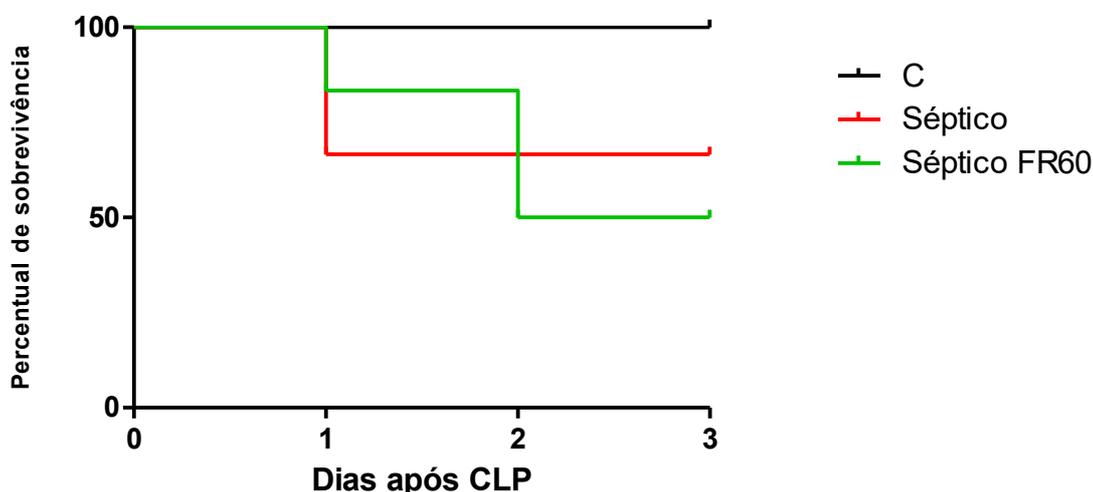


Figura 3. Análise de sobrevivência. A diferença geral na taxa de sobrevivência foi determinada pelo teste de Kaplan-Meier, seguido por um teste de log-rank. (n = 6 animais por grupo).

Discussão

A sepse, caracterizada por uma inflamação sistêmica exacerbada em resposta a um insulto infeccioso, representa alto risco de mortalidade (39). Apesar de nenhuma terapia específica para sepse ter se mostrado eficaz até o momento, o tratamento inclui antibioticoterapia, suporte das funções vitais do hospedeiro e restauração da homeostase (40). Com o aumento da resistência microbiana aos antibióticos o tratamento da sepse se torna cada vez mais difícil e a busca de novos antibacterianos se faz necessário. A sepse induzida por CLP consiste em uma infecção polimicrobiana endógena, promovida por meio de perfuração do ceco, que

permite o vazamento de bactérias intestinais na cavidade intraperitoneal, gerando peritonite e levando à sepse. Logo, avaliamos a atividade antibacteriana *in vitro* de três preparações provenientes das sementes de *M. oleifera*.

EXT, FR60 e WSMoL apresentaram atividade antibacteriana desde que apresentaram valores de CMI e CMB abaixo de 1 mg/mL (40) contra patógenos comumente envolvidos em sepse abdominal (41,42). As três preparações foram apenas bacteriostáticas contra *E. coli* (UFPEDA- 224), sendo EXT a mais eficiente. Ferreira et al. (43) avaliando a atividade antibacteriana do extrato 0,2% de sementes de *M. oleifera* e de WSMoL contra o isolado de *E. coli* WDCM-00013 encontraram valores de CMI de 5,0 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente. O extrato 10% testado aqui apresentou CMI 12,5 vezes menor que o extrato 0,2%, enquanto a CMI de WSMoL foi similar àquela determinada contra WDCM-00013. Este dado, portanto, revela que o aumento da eficiência bacteriostática do EXT contra o isolado UFPEDA-224 foi devido a maior extração de princípios ativos contra esta bactéria.

A avaliação com *S. aureus* revelou que EXT, FR60 e WSMoL foram agentes bacteriostáticos contra isolados susceptíveis à metilina (CMI menor que 0,45 mg/mL), enquanto apenas o EXT foi um bactericida eficiente contra *S. aureus* susceptível à metilina (CMB de 0,15 mg/mL). Os dados obtidos com quatro isolados MRSA mostraram que FR60 foi o agente bacteriostático mais eficiente (CMI menor que 0,11 mg/mL) e que apenas o EXT foi um eficiente bactericida contra três cepas de MRSA (UFPEDA-671, 672 e CA-MRSA LAC USA300). Ferreira et al. (43) também investigaram a atividade antibacteriana de WSMoL contra um isolado de *S. aureus* susceptível à metilina e reportaram ação bacteriostática (CMI 0,0078 mg/mL) e bactericida (CMB 0,3 mg/mL). Portanto, nosso estudo revela que as sementes de *M. oleifera* contém uma mistura de compostos, incluindo WSMoL, que agem diferentemente sobre bactéria envolvidas em sepse. Extratos de plantas contendo metabólitos secundários com atividade antibacteriana contra MRSA têm sido identificados (41) e estudos já demonstraram que WSMoL tem atividade antibacteriana e antibiofilme interferindo na permeabilidade celular, afetando o crescimento e sobrevivência de bactérias patogênicas (30,31, 42–45).

A terapia antibacteriana é apenas um dos inúmeros aspectos a serem considerados para a restauração da homeostase do paciente séptico. A manutenção do controle glicêmico é um parâmetro importante já que está associado a melhores desfechos com redução da mortalidade (47). Nosso estudo mostrou que FR60

normalizou os níveis glicêmicos de camundongos sépticos e reverteu o quadro de resistência à insulina. A resistência à insulina no fígado e tecidos periféricos na sepse é uma resposta adaptativa acompanhada, pelo menos na fase inicial, por hiperglicemia leve. No entanto, durante a evolução da sepse, o desenvolvimento de hipoglicemia, como foi observado em nosso estudo, deve ser evitado para melhorar a tolerância à doença (48). A redução da sinalização de insulina no músculo diminui a utilização de glicose, com o objetivo de prevenir a hipoglicemia, porém este é um mecanismo limitado. Por outro lado, a regulação negativa da sinalização de insulina no fígado pode não ser suficiente para prevenir a hipoglicemia. Isso ocorre porque a ativação da via LPS-TLR4, apesar de sua capacidade de prejudicar a sinalização de insulina, também é capaz de reduzir os níveis de glicose-6-fosfatase hepática (G6Pase) e, nesse sentido, diminuir a produção de glicose hepática (49). Embora a atividade da G6Pase não tenha sido determinada aqui, é plausível sugerir que FR60 contribui para a restauração da atividade de G6Pase, ativando a gliconeogênese hepática e prevenindo a hipoglicemia.

Estudos mostram que a resistência à insulina detectada em adipócitos, músculo esquelético e fígado de animais sépticos por CLP pode ser explicada pela ativação de vias inflamatórias (50–52). Matsuda et al. (53) usando o modelo de sepse por CLP mostraram ativação da via inflamatória NF- κ B e conseqüentemente uma redução na translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) do músculo esquelético de camundongos BALB/c como resultado da redução da via PI3-K/Akt. Os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias foram avaliados nos animais tratados com FR60 desde que esta foi a única preparação das sementes de *M. oleifera* que foi capaz de normalizar os níveis glicêmicos e reverter a resistência à insulina em camundongos sépticos. IL-6, IL-2 e TNF- α foram significativamente reduzidas quando comparada ao grupo séptico não tratado, o que explica a melhora na sensibilidade à insulina. O modelo de CLP induz uma liberação exacerbada de citocinas e mediadores inflamatórios, levando às alterações sistêmicas, como redução do consumo alimentar e água, perda de peso corporal, hiperpirexia, leucocitose e danos aos órgãos (54-56). Entre os mediadores pró-inflamatórios, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 tem sido fortemente associada aos efeitos deletérios da sepse anteriormente mencionados (57). Curiosamente, a administração de FR60 pode ser potencialmente benéfica para uso terapêutico em pacientes sépticos, uma

vez que apresenta interessante atividade antibacteriana contra *E. coli* e MRSA e uma potente ação anti-inflamatória e normoglicêmica.

Conclusão

O estudo revelou que três preparações de sementes de *M. oleifera* apresentam atividade antibacteriana contra MRSA e *E. coli*, importantes bactérias associadas ao quadro de sepse em humanos. Adicionalmente, foi determinado que a fração rica em proteínas (FR60) tem potencial uso no controle glicêmico e na melhora do quadro de resistência à insulina induzida pela sepse, estando esse efeito associado a diminuição do quadro inflamatório.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 472546/2012-0; 407192/2018-2), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, APQ-0661-2.08/15) e Ministério da Ciência Tecnologia, Inovação e Comunicação (MCTIC, 01200.003711/2011-11) pelo apoio financeiro. LCBBC, THN e PMGP agradecem ao CNPq pela bolsa de pesquisa. MKST e PMS agradecem à FACEPE pela bolsa de estudo e bolsa de pesquisa, respectivamente.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* março de 2017;43(3):304–77.
2. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet.* 18 de janeiro de 2020;395(10219):200–11.

3. Busani S, Serafini G, Mantovani E, Venturelli C, Giannella M, Viale P, et al. Mortality in Patients With Septic Shock by Multidrug Resistant Bacteria: Risk Factors and Impact of Sepsis Treatments. *J Intensive Care Med.* janeiro de 2019;34(1):48–54.
4. Vendemiato AVR, von Nowakowski A, Marson FA de L, Levy CE. Microbiological characteristics of sepsis in a University hospital. *BMC Infect Dis.* 14 de fevereiro de 2015;
5. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen J-A, Klugman K, et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet.* 9 de janeiro de 2016;387(10014):168–75.
6. Plummer MP, Deane AM. Dysglycemia and Glucose Control During Sepsis. *Clin Chest Med.* 2016;37(2):309–19.
7. Preechasuk L, Suwansaksri N, Ipichart N, Vannasaeng S, Permpikul C, Sriwijitkamol A. Hyperglycemia and glycemic variability are associated with the severity of sepsis in nondiabetic subjects. *J Crit Care.* 2017;38:319–23.
8. van Vught LA, Wiewel MA, Klein Klouwenberg PMC, Hoogendijk AJ, Scicluna BP, Ong DSY, et al. Admission Hyperglycemia in Critically Ill Sepsis Patients: Association With Outcome and Host Response. *Crit Care Med.* julho de 2016;44(7):1338–46.
9. Robba C, Bilotta F. Admission hyperglycemia and outcome in ICU patients with sepsis. *J Thorac Dis.* julho de 2016;8(7):E581–3.
10. Fan J, Li YH, Wojnar MM, Lang CH. Endotoxin-induced alterations in insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor, IRS-1, and MAP kinase in skeletal muscle. *Shock.* setembro de 1996;6(3):164–70.
11. Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res.* janeiro de 2012;135(1):127–30.

12. Woodske ME, Yokoe T, Zou B, Romano LC, Rosa TC, Garcia-Ocana A, et al. Hyperinsulinemia predicts survival in a hyperglycemic mouse model of critical illness. *Crit Care Med.* setembro de 2009;37(9):2596–603.
13. Park C, Kim JR, Shim JK, Kang BS, Park YG, Nam KS, et al. Inhibitory effects of streptozotocin, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1beta on glucokinase activity in pancreatic islets and gene expression of GLUT2 and glucokinase. *Arch Biochem Biophys.* 15 de fevereiro de 1999;362(2):217–24.
14. Kahles F, Meyer C, Möllmann J, Diebold S, Findeisen HM, Lebherz C, et al. GLP-1 secretion is increased by inflammatory stimuli in an IL-6-dependent manner, leading to hyperinsulinemia and blood glucose lowering. *Diabetes.* outubro de 2014;63(10):3221–9.
15. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, et al. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med.* 30 de outubro de 2011;17(11):1481–9.
16. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH. Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia.* janeiro de 1986;29(1):63–7.
17. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* setembro de 2002;110(6):851–60.
18. Ehses JA, Böni-Schnetzler M, Faulenbach M, Donath MY. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans.* junho de 2008;36(Pt 3):340–2.
19. Kuo T, McQueen A, Chen T-C, Wang J-C. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 872:99–126.
20. Weis S, Carlos AR, Moita MR, Singh S, Blankenhaus B, Cardoso S, et al. Metabolic Adaptation Establishes Disease Tolerance to Sepsis. *Cell.* 15 de junho de 2017; 169(7):1263-1275.e14.

21. da Silva KLC, Camacho AP, Mittestainer FC, Carvalho BM, Santos A, Guadagnini D, et al. Atorvastatin and diacerein reduce insulin resistance and increase disease tolerance in rats with sepsis. *J Inflamm (Lond)*. 2018;15:8.
22. Park S, Kim D-G, Suh GY, Kang JG, Ju Y-S, Lee Y-J, et al. Mild hypoglycemia is independently associated with increased risk of mortality in patients with sepsis: a 3-year retrospective observational study. *Crit Care*. 12 de outubro de 2012;16(5):R189.
23. Waeschle RM, Moerer O, Hilgers R, Herrmann P, Neumann P, Quintel M. The impact of the severity of sepsis on the risk of hypoglycaemia and glycaemic variability. *Crit Care*. 2008;12(5):R129.
24. Gogitidze Joy N, Hedrington MS, Briscoe VJ, Tate DB, Ertl AC, Davis SN. Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes Care*. julho de 2010; 33(7):1529–35.
25. Wang J, Alexanian A, Ying R, Kizhakekuttu TJ, Dharmashankar K, Vasquez-Vivar J, et al. Acute exposure to low glucose rapidly induces endothelial dysfunction and mitochondrial oxidative stress: role for AMP kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. março de 2012; 32(3):712–20.
26. Ali NA, O'Brien JM, Dungan K, Phillips G, Marsh CB, Lemeshow S, et al. Glucose variability and mortality in patients with sepsis. *Crit Care Med*. agosto de 2008; 36(8):2316–21.
27. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. Moringa oleifera Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*. dezembro de 2016;17(12):2141.
28. Randriamboavonjy JI, Heurtebise S, Pacaud P, Loirand G, Tesse A. *Moringa oleifera* Seeds Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 13 de maio de 2019 [citado 16 de julho de 2019];2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6535829/>

29. Liang L, Wang C, Li S, Chu X, Sun K. Nutritional compositions of Indian *Moringa oleifera* seed and antioxidant activity of its polypeptides. *Food Sci Nutr*. maio de 2019;7(5):1754–60.
30. Moura MC, Trentin DS, Napoleão TH, Primon-Barros M, Xavier AS, Carneiro NP, et al. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. *J Appl Microbiol*. outubro de 2017;123(4):861–74.
31. Moura MC, Napoleão TH, Coriolano MC, Paiva PMG, Figueiredo RCBQ, Coelho LCBB. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol*. setembro de 2015;119(3):666–76.
32. Coriolano MC, de Santana Brito J, de Siqueira Patriota LL, de Araujo Soares AK, de Lorena VMB, Paiva PMG, et al. Immunomodulatory Effects of the Water-soluble Lectin from *Moringa oleifera* Seeds (WSMoL) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). *Protein Pept Lett*. 2018;25(3):295–301.
33. Araújo LCC, Aguiar JS, Napoleão TH, Mota FVB, Barros ALS, Moura MC, et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e81973.
34. Wang F, Zhong H-H, Chen W-K, Liu Q-P, Li C-Y, Zheng Y-F, et al. Potential hypoglycaemic activity phenolic glycosides from *Moringa oleifera* seeds. *Nat Prod Res*. agosto de 2017;31(16):1869–74.
35. Al-Malki AL, El Rabey HA. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. *Biomed Res Int*. 2015;2015:381040.
36. Coelho JS, Santos NDL, Napoleão TH, Gomes FS, Ferreira RS, Zingali RB, et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*. novembro de 2009;77(7):934–8.
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. novembro de 1951;193(1):265–75.

38. Paiva PMG, Coelho LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol*. 1992;36(2):113–8.
39. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 de fevereiro de 2016;315(8):762–74.
40. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med*. 2018;44(6):925–8.
41. Surewaard BGJ, Thanabalasuriar A, Zeng Z, Tkaczyk C, Cohen TS, Bardoel BW, et al. α -Toxin Induces Platelet Aggregation and Liver Injury during *Staphylococcus aureus* Sepsis. *Cell Host & Microbe*. 8 de agosto de 2018;24(2):271–284.e3.
42. Simmons MD, Daniel S, Temple M. Sepsis programme successes are responsible for the increased detection of bacteraemia. *Journal of Hospital Infection*. 1o de janeiro de 2019;101(1):93–9.
43. Ferreira RS, Napoleão TH, Santos AFS, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MG, Morais MMC, et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Letters in Applied Microbiology*. 2011;53(2):186–92.
44. Lima IM de SF, Zagmignan A, Santos DM, Maia HS, Silva L dos S, Cutrim B da S, et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. *Sci Rep*. 3 de dezembro de 2019;9(1):1–14.
45. Moura MC, Procópio TF, Ferreira GRS, Alves RRV, Sá RA, Paiva PMG, et al. Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on nonresistant and multidrug resistant isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 24 de janeiro de 2021;
46. da Silva PM, Baldry M, Peng P, de Oliveira Silva JN, Soares T, Brayner FA, et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability,

aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Int J Biol Macromol*. 15 de fevereiro de 2019; 123:600–8.

47. Kushimoto S, Abe T, Ogura H, Shiraishi A, Saitoh D, Fujishima S, et al. Impact of blood glucose abnormalities on outcomes and disease severity in patients with severe sepsis: An analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. *PLoS One*. 11 de março de 2020;

48. Weis S, Carlos AR, Moita MR, Singh S, Blankenhaus B, Cardoso S, et al. Metabolic Adaptation Establishes Disease Tolerance to Sepsis. *Cell*. 15 de junho de 2017;169(7):1263-1275.e14.

49. Mutel E, Abdul-Wahed A, Ramamonjisoa N, Stefanutti A, Houberdon I, Cavassila S, et al. Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J Hepatol*. março de 2011;54(3):529–37.

50. Heuer JG, Bailey DL, Sharma GR, Zhang T, Ding C, Ford A, et al. Cecal ligation and puncture with total parenteral nutrition: a clinically relevant model of the metabolic, hormonal, and inflammatory dysfunction associated with critical illness. *J Surg Res*. outubro de 2004;121(2):178–86.

51. Matsuda N, Yamamoto S, Yokoo H, Tobe K, Hattori Y. Nuclear factor- κ B decoy oligodeoxynucleotides ameliorate impaired glucose tolerance and insulin resistance in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care Med*. outubro de 2009;37(10):2791–9.

52. Singamsetty S, Shah FA, Guo L, Watanabe Y, McDonald S, Sharma R, et al. Early initiation of low-level parenteral dextrose induces an accelerated diabetic phenotype in septic C57BL/6J mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. janeiro de 2016;41(1):12–9.

53. Matsuda N, Yamamoto S, Yokoo H, Tobe K, Hattori Y. Nuclear factor- κ B decoy oligodeoxynucleotides ameliorate impaired glucose tolerance and insulin resistance in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis *. *Critical Care Medicine*. outubro de 2009; 37(10):2791.

54. da Silva KLC, Camacho AP, Mittestainer FC, Carvalho BM, Santos A, Guadagnini D, et al. Atorvastatin and diacerein reduce insulin resistance and increase disease tolerance in rats with sepsis. *J Inflamm (Lond)*. 9 de maio de 2018; 9(15):8.
55. Delile E, Nevière R, Thiébaud P-A, Maupoint J, Mulder P, Coquerel D, et al. Reduced Insulin Resistance Contributes to the Beneficial Effect of Protein Tyrosine Phosphatase-1B Deletion in a Mouse Model of Sepsis. *Shock*. setembro de 2017; 48(3):355–63
56. Pereira RS, Bertoncheli CM, Adefegha SA, Castilhos LG, Silveira KL, Rezer JFP, et al. Sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP) alters nucleotidase activities in platelets of rats. *Microb Pathog*. outubro de 2017; 111:345–51
57. Li J-L, Li G, Jing X-Z, Li Y-F, Ye Q-Y, Jia H-H, et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. *J Int Med Res*. junho de 2018;46(6):2410–22.

4.2 Preparações de sementes de *Moringa oleifera* modulam metabólitos fecais, melhoram a tolerância à glicose, reduzem inflamação e esteatose hepática em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Journal of Ethnopharmacology”



Fator de Impacto: 3.69

Preparações de sementes de *Moringa oleifera* modulam metabólitos fecais, melhoram a tolerância à glicose e reduzem inflamação e esteatose hepática em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

Marília Kalinne da Silva Torres^a, Yasmim Aline de Araújo Castro^b, Ana Maria Rampeloti Almeida^b, Amanda Mota Vieira^b, Stefani da Silva Mendes da Silva^b, Ruy Bandeira de Vasconcelos Junior^b, Milena Damasceno de Souza Costa, Vitória Camilo^a, Dayane Aparecida Gomes^c, Marina Falcão de Souza Cartaxo^d, Alisson Macário de Oliveira^a, Luiz Caetano^e, Edson de Souza Bento^e, Jeferson Santana Ursulino^e, Alexandre Cramo Crispim^e, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Bruno de Melo Carvalho^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^a.

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^b Laboratório de Imunometabolismo, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^c Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^d Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^e Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), Universidade Federal de Alagoas, Macéio, Alagoas, Brasil.

***Corresponding author.** Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

RESUMO

Relevância etnofarmacológica: As sementes de *Moringa oleifera* utilizadas na purificação de água para consumo humano contêm a lectina WSMoL, que apresenta atividade anti-inflamatória e imunomoduladora. **Objetivo do estudo:** Dieta hiperlipídica induz alterações na microbiota intestinal que está associada a desordens metabólicas como inflamação crônica de baixo grau, resistência à insulina e acúmulo de gordura no fígado. Nesse estudo foi avaliado o efeito de três preparações obtidas de sementes de *M. oleifera* sobre inflamação, acúmulo de gordura hepática, sensibilidade à insulina e o perfil dos metabólitos fecais em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. **Materiais e métodos:** Obesidade e a resistência à insulina foram induzidas em camundongos Swiss com dieta hiperlipídica por 8 semanas. O tratamento oral com preparações de *M. oleifera* (Extrato aquoso, EXT; fração proteica, FR60 e lectina WSMoL) ou água destilada (veículo) foi realizado por 30 dias. Sangue da veia caudal foi coletado para realização do teste de tolerância à glicose (GTT). Citocinas inflamatórias foram dosadas por citometria de fluxo e análises histológicas do tecido adiposo epididimal e fígado foram realizadas. Os metabólitos fecais foram avaliados através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). **Resultados:** Os camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram resistência à insulina, acúmulo de gordura hepática e inflamação crônica de baixo grau. O tratamento com FR60 melhorou a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em camundongos obesos. Todas as preparações de semente de *M. oleifera* reduziram os níveis circulantes de TNF- α e INF- γ quando comparados ao grupo obeso não tratado. EXT e FR60 reduziram significativamente o conteúdo lipídico hepático em camundongos obesos. Também foi observada redução de infiltrado inflamatório no tecido adiposo de camundongos obesos tratados com EXT e FR60. Camundongos obesos tratados com EXT, FR60 e WSMoL apresentaram redução nos níveis fecais de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), colina, alanina e lisina quando comparados ao OB não tratado. OB-EXT e OB-WSMoL apresentaram maiores níveis de TMA e MA, e redução de etanol em amostras fecais.

Conclusões/Importância: EXT, FR60 e WSMoL promoveram um ou mais efeitos benéficos sobre os parâmetros metabólicos avaliados, revertendo a inflamação, reduzindo o acúmulo de gordura hepática, melhorando a tolerância à glicose e modulando o perfil de metabólitos fecais em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Logo, é evidente o potencial dessas preparações com relevância biotecnológica para uso na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*, Resistência à insulina; Inflamação, Metabólitos fecais

1. Introdução

A obesidade é uma doença de proporções epidêmicas, sendo considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), doença cardiovascular e fígado gorduroso não alcoólico (Friedman et al., 2018; Parnell et al., 2012). Vários fatores estão associados ao desenvolvimento da obesidade, dentre eles a predisposição genética, desregulação hormonal e fatores ambientais, como sedentarismo e consumo de alimentos ricos em açúcares e gorduras (Gil-Cardoso et al., 2017; Netto Candido et al., 2018).

Os distúrbios metabólicos relacionados à obesidade estão intimamente associados a um estado inflamatório crônico de baixo grau. Já foi demonstrado, no tecido adiposo e hepático de indivíduos obesos, infiltração e acúmulo de macrófagos que contribuem para secreção de citocinas pró-inflamatórias (Nguyen et al., 2007). Tais citocinas levam à ativação intracelular do complexo inibidor IKK/NF- κ B, e da via JNK/MAPK, que prejudicam a sinalização da insulina (Rebollo-Hernanz et al., 2019; Zhang et al., 2011). Como resultado, a via de sinalização da PI3K/AKT é interrompida, inibindo a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana celular e dessa forma impedindo a captação de glicose (Li and Yu, 2013; Lumeng et al., 2007). Nesse contexto, o bloqueio da via inflamatória surge como um alvo atraente para reduzir as consequências relacionadas a resistência à insulina induzida pela obesidade e há um interesse crescente por novas estratégias terapêuticas.

Nos últimos anos, a microbiota intestinal emergiu como um importante regulador do metabolismo energético do hospedeiro, existindo várias evidências de seu envolvimento na inflamação crônica de baixo grau relacionada à obesidade e suas complicações (Suk and Kim, 2019; Tong et al., 2018). Uma dieta rica em gordura altera a composição da microbiota intestinal e está relacionada ao aumento da permeabilidade intestinal, levando ao desenvolvimento de endotoxemia e distúrbios metabólicos sistêmicos (Araújo et al., 2017; Lin et al., 2016; Moreno-Navarrete et al., 2012). O consumo de produtos à base de plantas pode ter efeitos benéficos na restauração da microbiota intestinal saudável e dessa forma prevenir distúrbios metabólicos associados a obesidade (Ejtahed et al., 2019).

Moringa oleifera Lam (*M. oleifera*) é uma das quatorze espécies do gênero *Moringa*, pertencente à família Moringaceae. Atualmente é cultivada em países tropicais de todo o mundo, incluindo o Brasil (Ferreira et al. 2008). Trata-se de um vegetal de múltiplos usos e que apresenta uma grande variedade de propriedades farmacológicas (Amaglo et al., 2010; Ijarotimi et al., 2013). As sementes, que são utilizadas no tratamento de água para consumo humano (Bichi, 2013), contêm a lectina (proteína ligadora de carboidratos) WSMoL que apresenta atividades coagulante e antibacteriana (Ferreira et al., 2011; Moura et al., 2017, 2015). Ainda, o extrato aquoso à 10% de sementes e WSMoL apresentaram atividades anti-inflamatória e imunomoduladora in vitro (Araújo et al., 2013a; Coriolano et al., 2018) e Ajibola, Eunice e Stephanie (2014) mostraram que o extrato aquoso à 25% obtido de sementes de *M. oleifera* apresentou efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos tipo 1 induzidos por aloxana. Recentemente, nosso grupo de pesquisa, mostrou que WSMoL em uma dose de 5 mg/kg/dia reduziu os níveis glicêmicos em camundongos diabéticos (dados aceitos para publicação).

Este estudo avaliou extrato em água (EXT), fração proteica (FR60) e WSMoL produzidos a partir de sementes de *M. oleifera* quanto ao efeito na produção de metabólitos microbianos intestinais, perfil inflamatório, esteatose hepática e na sensibilidade à insulina de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica.

2. Materiais e Métodos

2.1. Extrato em água (EXT), Fração proteica 60% (FR60) e WSMoL de sementes de *M. oleifera*.

As sementes de *M. oleifera* foram coletadas na cidade do Recife (PE) sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente para coleta de plantas (número 38690-1). O pó das sementes foi extraído em água destilada sob agitação (16h a 28°C) em uma proporção a 10%. Após filtração em gaze e centrifugação (3000g, 15 min), o sobrenadante coletado correspondeu ao extrato 10% (EXT). A fração proteica 60% (FR60) foi obtida após precipitação (4h a 28°C) das proteínas do EXT utilizando sulfato de amônio (60% de saturação) de acordo com Green and Hughes (1955). WSMoL foi isolada de acordo com Coelho et al. (2009) por cromatografia de FR60 em coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com NaCl 0,15 M (fluxo de 0,3 mL/min) e eluição da lectina adsorvida com ácido acético 1,0 M. Em seguida, WSMoL foi dialisada (membrana de 3,5 kDa) contra NaCl 0,15 M (6h a 4 °C).

A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando albumina de soro bovino como padrão. A atividade hemaglutinante foi realizada em placa de microtitulação de acordo com o método descrito por Paiva and Coelho (1992).

2.2. Animais

Camundongos Swiss machos foram obtidos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da UFPE e mantido sob um ciclo claro / escuro (12:12) a 22 °C. Água e ração padrão (Labina, Purina, Brasil: 8% de gordura, 26% de proteína, 54% de carboidrato) estavam disponíveis ad libitum. O projeto foi aprovado (processo nº 0042/2017) pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Internacional de Ciência Animal de Laboratório (ICLAS) e os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório (SBCAL).

2.3. Indução de obesidade e tratamento

Obesidade e resistência à insulina foram induzidas com dieta rica em gordura por 8 semanas (55% da energia derivada da gordura, 29% dos carboidratos e 16% das proteínas) enquanto os animais do grupo controle, receberam ração padrão para roedores pelo mesmo período (8% de gordura, 26% de proteína, 54% de

carboidratos, como uma porcentagem do total de kcal). Após 8 semanas da indução de obesidade, os animais obesos (OB) e aqueles do grupo controle (C) receberam por gavagem o tratamento com EXT (400 mg/kg), FR60 (40 mg/kg), WSMoL (5 mg/kg) ou água destilada (veículo) durante 30 dias. Os animais foram divididos em 5 grupos de acordo com a dieta e tratamento: grupo controle (C), grupo obeso (OB), grupo obeso tratado com EXT (OB-EXT), grupo obeso tratado com FR60 (OB-FR60), grupo obeso tratado com WSMoL (OB-WSMoL).

2.4. Teste de Tolerância à glicose

No 28º dia de tratamento os animais foram submetidos a 8 h de jejum para realização do teste de tolerância à glicose (GTT). Os camundongos receberam injeção intraperitoneal de uma solução de glicose (1 g/kg) e a glicemia foi medida antes da injeção e após 15, 30, 60, 90 e 120 min a partir de amostras de sangue coletados da veia caudal utilizando glicosímetro FreeStyle Optium H (Abbott).

2.5. Dosagem de citocinas

O sangue foi coletado da veia cava dos camundongos em jejum e processado para obtenção do soro. Os níveis séricos das citocinas TNF- α ; INF- γ ; IL-6; IL-2; IL-4; IL-17; IL-10 foram dosadas utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) da Becton Dickinson-BD. As amostras de soro foram processadas de acordo com indicações do Kit e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo Modelo Accuri C6 System (BD Accuri™ C6). A análise do perfil de citocinas foi feita segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do BD CBA Analyses Software.

2.6. Análise histológica

Após o 30º dia de tratamento, fragmentos de tecido adiposo epididimal e fígado foram extraídos, pesados e imediatamente fixados em formalina tamponada a 10% por 24h. Posteriormente, os fragmentos de tecidos foram desidratados em soluções de concentração crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), imersos em xilol e, a seguir, incluídos em parafina. Em seguida, os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 5 μ m com o auxílio de um micrótomo e corados pelo método Hematoxilina- Eosina (H&E). Os materiais foram observados ao microscópio Motic BA200 acoplado a uma câmera digital Moticam 1000 1.3 MP (Motic Inc., Ltd.,

Causeway Bay, Hong Kong). As seções adiposas foram examinadas para o número de estruturas semelhantes a coroa (CLS) dentro dos diferentes grupos usando um microscópio óptico (Zeiss, Goettingen, Alemanha). CLS foram contados em quatro quadrantes em triplicata (aumento de 400 ×). O tamanho dos adipócitos e os níveis de esteatose hepática foram determinados usando o programa Image J.

2.7. Coleta de amostras fecais

Após 30 dias de tratamento os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de solução de quetamina (75 mg/Kg) e diazepam (5 mg/Kg), a cavidade abdominal foi aberta e o intestino grosso exposto. As amostras fecais foram coletadas direto do intestino grosso dos camundongos e pelo menos 3 pelotas de fezes foram coletadas de cada camundongo, transferidas para os tubos eppendorf de 1,5 mL e imediatamente congeladas a -80°C para futuras análises.

2.8. Preparação e análise de amostras fecais por ressonância magnética nuclear (RMN)

Para obtenção de águas fecais foram utilizados 1200 µL de tampão fosfato (pH=7,0 ~ 7,4) em 50 mg do material fecal. Após completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 15min a 14000rpm e 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C.

Para realização da RMN, alíquotas de 1,5 mL foram centrifugadas a 14000 rpm (ST 40 R, SORVALL – Thermo Scientific) por 15 min e em seguida, 500 µL de cada sobrenadante foram transferidos individualmente para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. Às amostras foi adicionado 200 µL de uma solução tampão (tampão fosfato de sódio, 100% de D2O, pH = 7,4 e 1 mM de TSP (padrão de deslocamento)). Todo experimento de RMN foi realizado em espectrômetro Bruker AVANCE III 600 MHz equipado com sonda PABBO de 5 mm a 300K. Todos os espectros de RMN-1H foram realizados utilizando-se da sequência de pulsos noesypr1d para supressão do sinal de ressonância da água por pré-saturação. Para todos os experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros: NS: 64 (número de experimentos); DS: 4 (número de experimentos falsos); D1: 4,00 s (tempo de relaxação); D8: 0,09 s (tempo de mistura); TD: 64K (número de pontos do espectro); SW: 20,0290 ppm (largura da janela); O1P: 4,69 ppm (posição onde aparece o sinal referente a água e, portanto, é irradiada); AQ: 2,72 s (tempo de aquisição); P1: 90° (ângulo do pulso)

Os espectros foram pré-processados no software TopSpin® 4.0.7, onde foram realizados correção de fase e calibração do deslocamento químico com referência no TSP ($\delta = 0$ ppm). Para identificação dos metabólitos utilizou-se do software Chenomx® e do banco de dados disponível na plataforma online www.hmdb.ca. A matriz de dados foi preparada utilizando-se do software MatLab®, onde todos os espectros foram sobrepostos, alinhados, cortados e normalizados, por fim os dados foram transportados para o Excel® formando uma matriz de dados contendo aproximadamente 24 mil variáveis. Para a análise estatística multivariada utilizou-se do software Simca® e da plataforma online www.metaboanalyst.ca.

2.9. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, seguida de pós-teste de *Bonferroni* para comparação múltipla de médias. Os resultados que apresentaram um nível de significância menor que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados significantes.

3. Resultados

3.1. EXT, FR60 e WSMoL não reduzem o ganho de peso, mas FR60 melhora a tolerância à glicose e a resistência à insulina em camundongos obesos

O peso corporal dos animais é apresentado na figura 1A. Todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica (OB) apresentaram ganho de peso significativamente maior, a partir da terceira semana até o final do experimento, em comparação ao grupo alimentado com ração padrão). Os camundongos OB tratados com EXT, FR60 e WSMoL apresentaram ganho de peso similar aos animais OB não tratados ao longo das 12 semanas de experimento (Figura 1B). As figuras 1C e 1D mostram que não houve alteração no peso relativo dos tecidos adiposo epididimal e hepático em camundongos OB quando comparado ao controle.

Os dados do teste de tolerância à glicose (GTT) revelam que apenas o grupo OB-FR60 apresentou redução significativa nos níveis glicêmicos nos tempos 60', 90' e 120' quando comparado ao grupo OB (Figura 1E). A redução nos níveis glicêmicos refletiu na diminuição da área sob a curva (AUC) do grupo OB-FR60 revertendo a

intolerância à glicose induzida pela dieta hiperlipídica (Figura 1F). Os valores determinados para os grupos OB-EXT e OB-WSMoL não diferiram do grupo OB (Figura 1F).

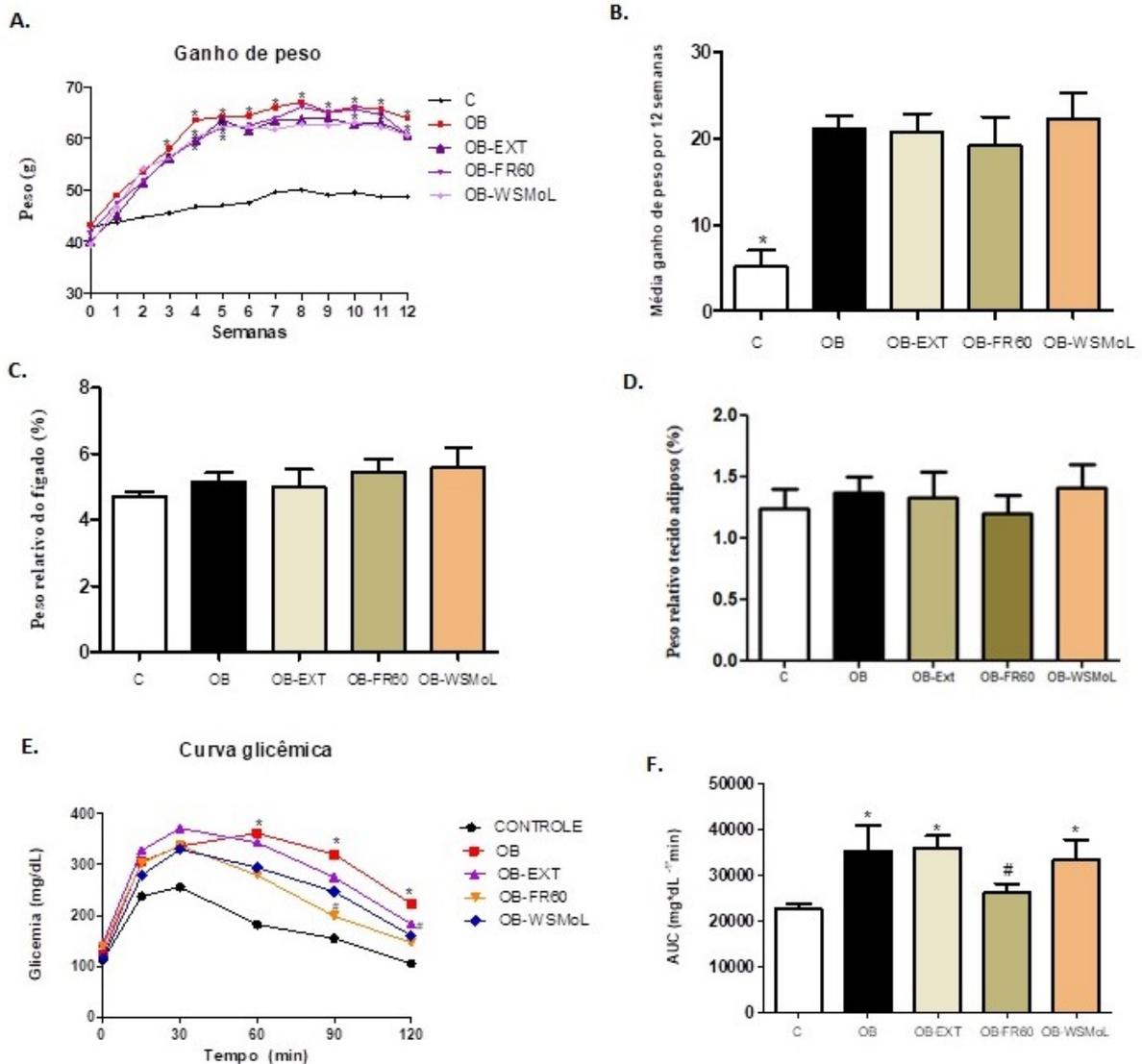


Figura 1. Efeito fisiológico e metabólico em camundongos controle (C), obesos (OB), obesos tratados com Extrato (OB-EXT), fração proteica (OB-FR60) ou WSMoL (OB-WSMoL). (A) ganho de peso. (B) Ganho de peso médio em 12 semanas. (C) Relação peso do fígado / peso corporal. (D) Relação tecido adiposo / peso corporal. (E) Teste de tolerância à glicose (GTT). (F) Área sob a curva do GTT. Os resultados são expressos como média \pm SEM. $n = 5$ animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao obeso.

3.2. EXT, FR60 e WSMoL reduzem os níveis séricos de citocinas inflamatórias

Camundongos OB apresentaram níveis séricos de TNF- α e INF- γ significativamente maiores que os camundongos do grupo controle (Figura 3A e 3B).

Os tratamentos com o EXT, FR60 e WSMoL promoveram uma diminuição significativa nos níveis circulantes de TNF- α e INF- γ , retornando aos níveis séricos observados no grupo controle (Figura 3A e 3B). Os níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 foram similares em todos os grupos experimentais (Figuras 3C, 3D, 3E, 3F e 3G).

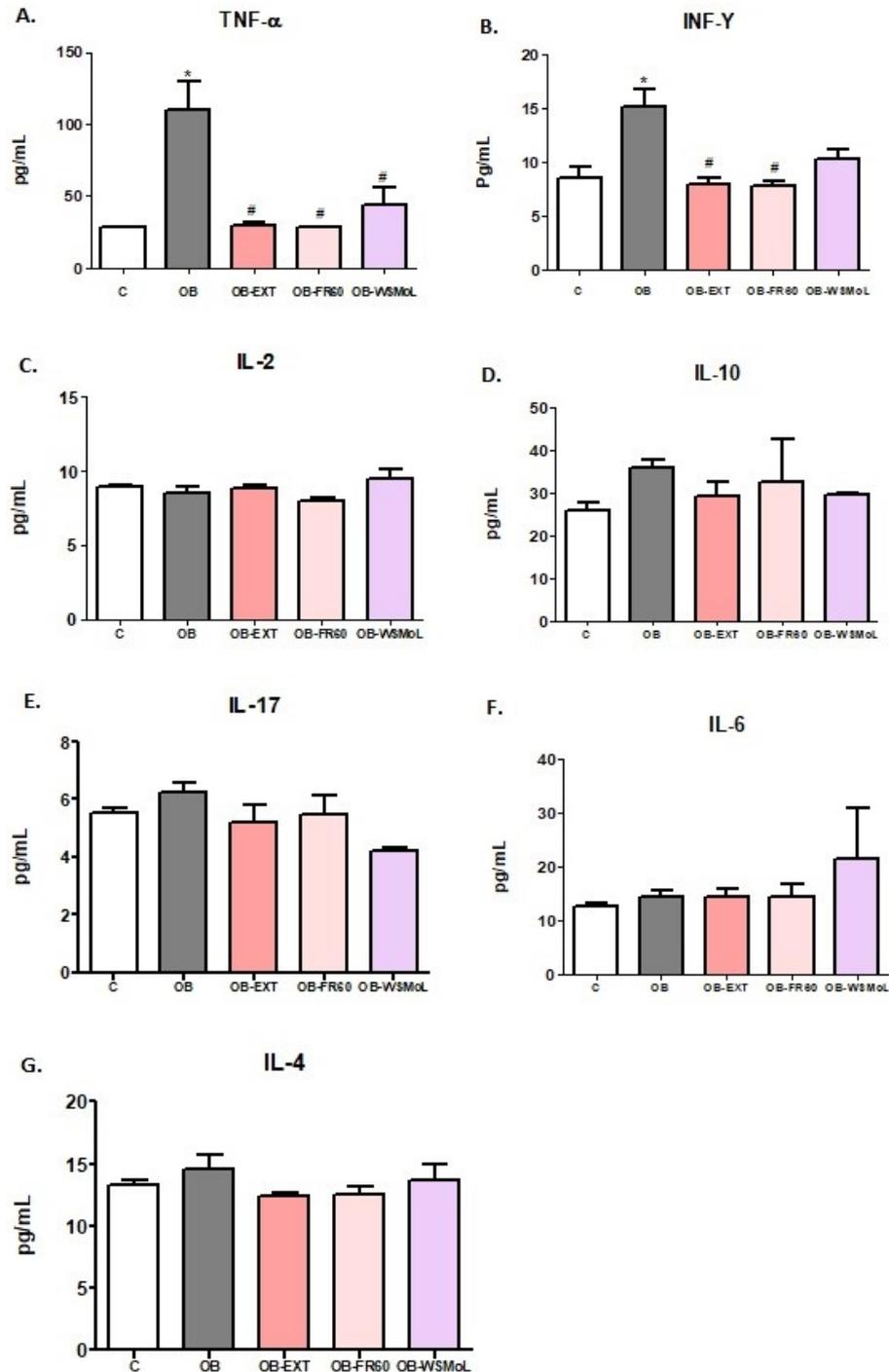


Figura 2. Níveis séricos de citocinas em camundongos controle (C), obesos (OB), obesos tratados com Extrato (OB-Ext), fração de proteína (OB-FR60) ou WSMoL (OB-WSMoL). (A) Níveis séricos de

TNF- α , (B) Níveis séricos de INF- γ (C) Níveis séricos de IL-2 (D) Níveis séricos de IL-10 (E) Níveis séricos de IL-17 (F) níveis de IL-6 (G) no soro de IL-4. Os dados são média \pm DP (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de *Bonferroni*. A significância estatística é indicada por * OR # P <0,05 (* diferente do controle e # diferente do OB).

3.3. Efeitos do tratamento com EXT, FR60 e WSMoL na esteatose hepática e infiltrado inflamatório de tecido adiposo de camundongos obesos

Fragmentos histológicos do fígado de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica sem nenhum tratamento apresentaram grande número de macro e microvesículas de gordura em comparação com as seções do grupo controle, caracterizando um elevado grau de esteatose hepática. O tratamento com EXT e FR60 resultou em redução significativa do acúmulo de gordura no parênquima hepático de camundongos obesos, enquanto o tratamento com WSMoL não interferiu no acúmulo de gordura hepática (Figura 3). A avaliação histológica das células do tecido adiposo revelou diferenças significativas no tamanho dos adipócitos dos grupos OB em comparação ao do grupo controle (Figura 4). O tratamento com EXT e FR60 reduziu a área dos adipócitos (Figura 4), mas WSMoL não foi eficiente. A figura 4 também mostra o aumento significativo no número de estruturas do tipo coroa (CLSs) no tecido adiposo de camundongos dos grupos OB quando comparado com os grupos OB-EXT e OB-FR60.

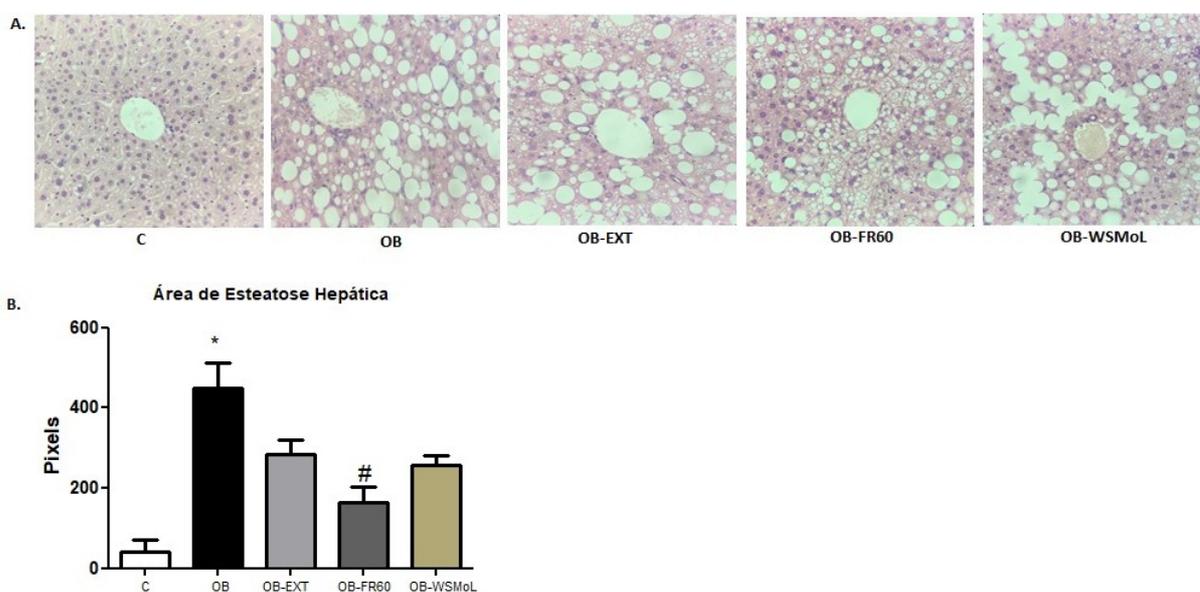


Figura 3. Caracterização morfológica de amostras de tecido hepático. (A) Coloração com hematoxilina e eosina de cortes histológicos de 5 μ m do fígado de camundongos controle, OB, OB-

EXT, OB-FR60 e OB-WSMoL. (B) Grau de esteatose no fígado. Barra de escala = 20 μ m de todas as imagens. Ampliação original 400X. Cada barra representa a média \pm S.E.M. de cinco experiências diferentes. * $p < 0,05$ OB vs. grupo controle e # $p < 0,05$ OB-Ext vs. grupo OB.

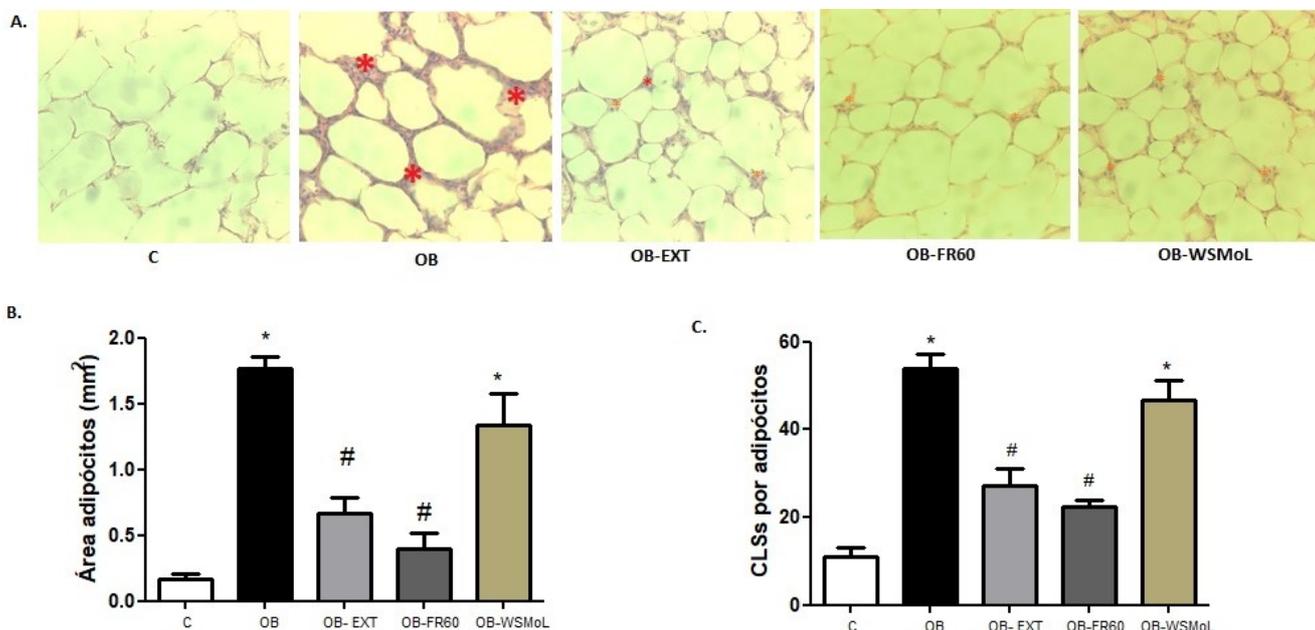


Figura 4. O efeito dos tratamentos com EXT, FR60 e WSMoL na prevalência de *CLSs no tecido adiposo epididimal e tamanho dos adipócitos. (A) Coloração com hematoxilina e eosina de cortes histológicos de 5 μ m de tecidos adiposos de camundongos controle, OB, OB-EXT, OB-FR e OB-WSMoL. (B) Área dos adipócitos (C) Quantificação de CLSs. Barra de escala = 20 μ m de todas as imagens. Ampliação original \times 400. Cada barra representa a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ OB vs. grupo controle e # $p < 0,05$ OB-EXT e OB-FR60 vs. grupo OB.

3.4. Metabólitos detectados em amostras fecais de camundongos dos grupos controle, obeso e obeso tratado com EXT, FR60 e WSMoL

Os espectros médios de RMN-1H de amostras fecais de camundongos controle e obesos continham informações ricas em metabólitos, confirmados com uma série de espectros 2D por RMN, incluindo aminoácidos, hidratos de carbono, nucleotídeos, bases orgânicas, ácidos orgânicos, tais como os ácidos graxos de cadeia curta, relacionados ao metabolismo da microbiota intestinal. Análise da regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostra que o grupo controle é diferente dos grupos obesos, e que há uma alta semelhança metabólica entre os grupos obeso e obesos tratados (Figura 5). As trajetórias metabólicas derivadas do PLS-DA por meio do índice VIP (variable importance in the projection) mostraram

características dinâmicas nas concentrações de metabólitos fecais entre os grupos controle, obesos e obesos tratados com EXT, FR60 e WSMoL (Figura 6).

Análise dos espectros revelaram que os níveis de alguns metabólitos, incluindo MA, TMA, tirosina, lisina, sarcosina, propionato, butirato, acetato e colina eram mais baixos no grupo OB quando comparado ao controle. Por outro lado, aumento nos níveis de etanol, alfa-cetoisovalerato, glicina e DMA foram observados no grupo OB em comparação ao controle (Figura 7).

Com relação aos tratamentos, camundongos obesos tratados com EXT, FR60 e WSMoL apresentaram redução nos níveis fecais de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), colina, alanina e lisina quando comparados ao OB não tratado. OB-EXT e OB-WSMoL apresentaram maiores níveis de TMA e MA; e redução de etanol (Figura 7).

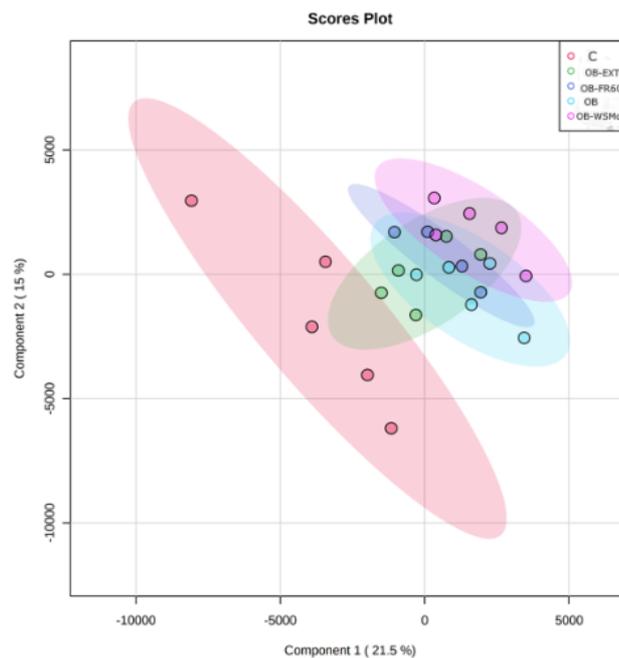


Figura 5. PLS-DA discriminando os extratos fecais dos diferentes grupos experimentais.

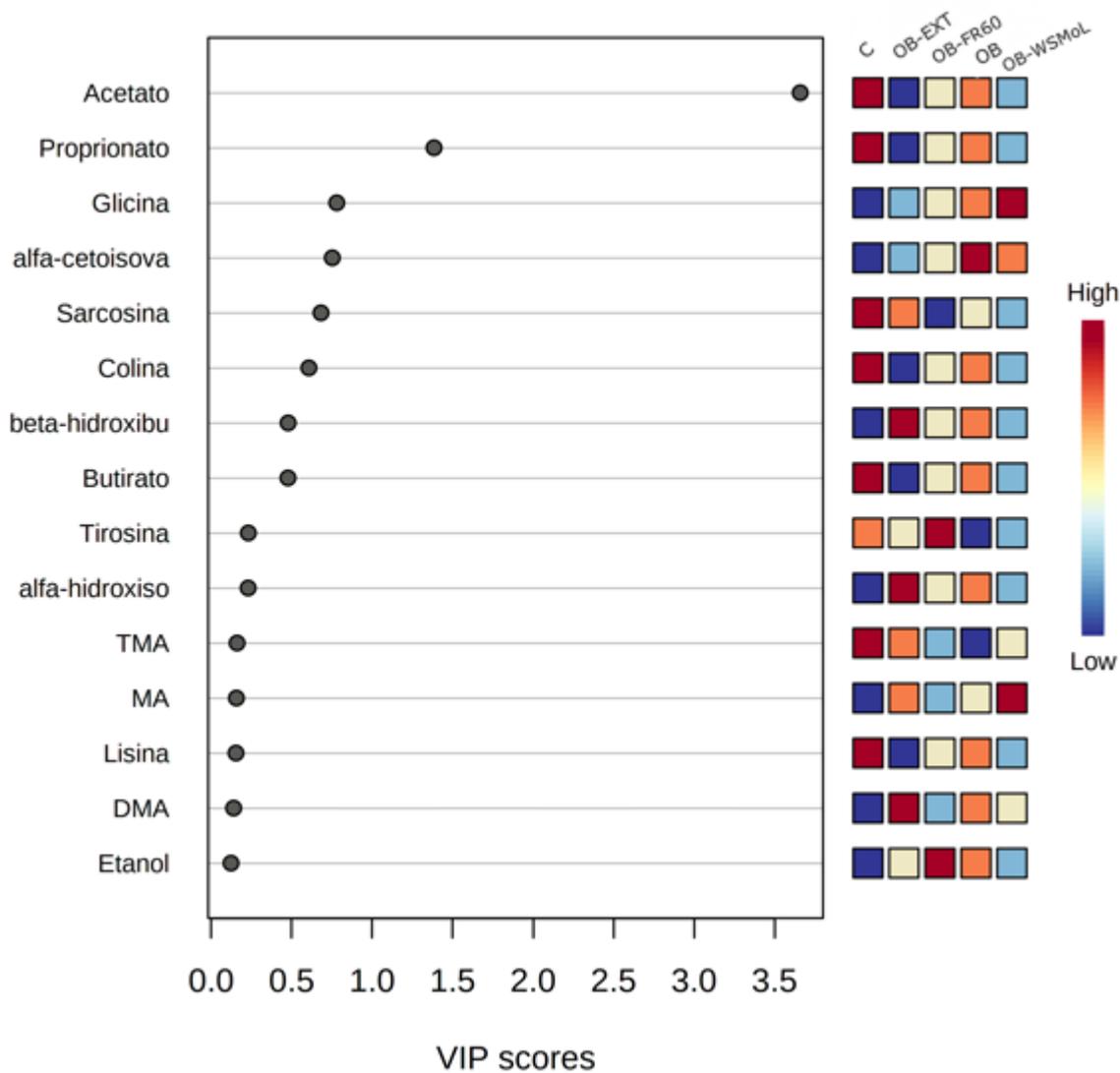


Figura 6. VIP do PLS-DA discriminando os metabólitos fecais em camundongos controles, obesos e obesos tratados com EXT, FR60 e proteína WSMoL codificados por cores.

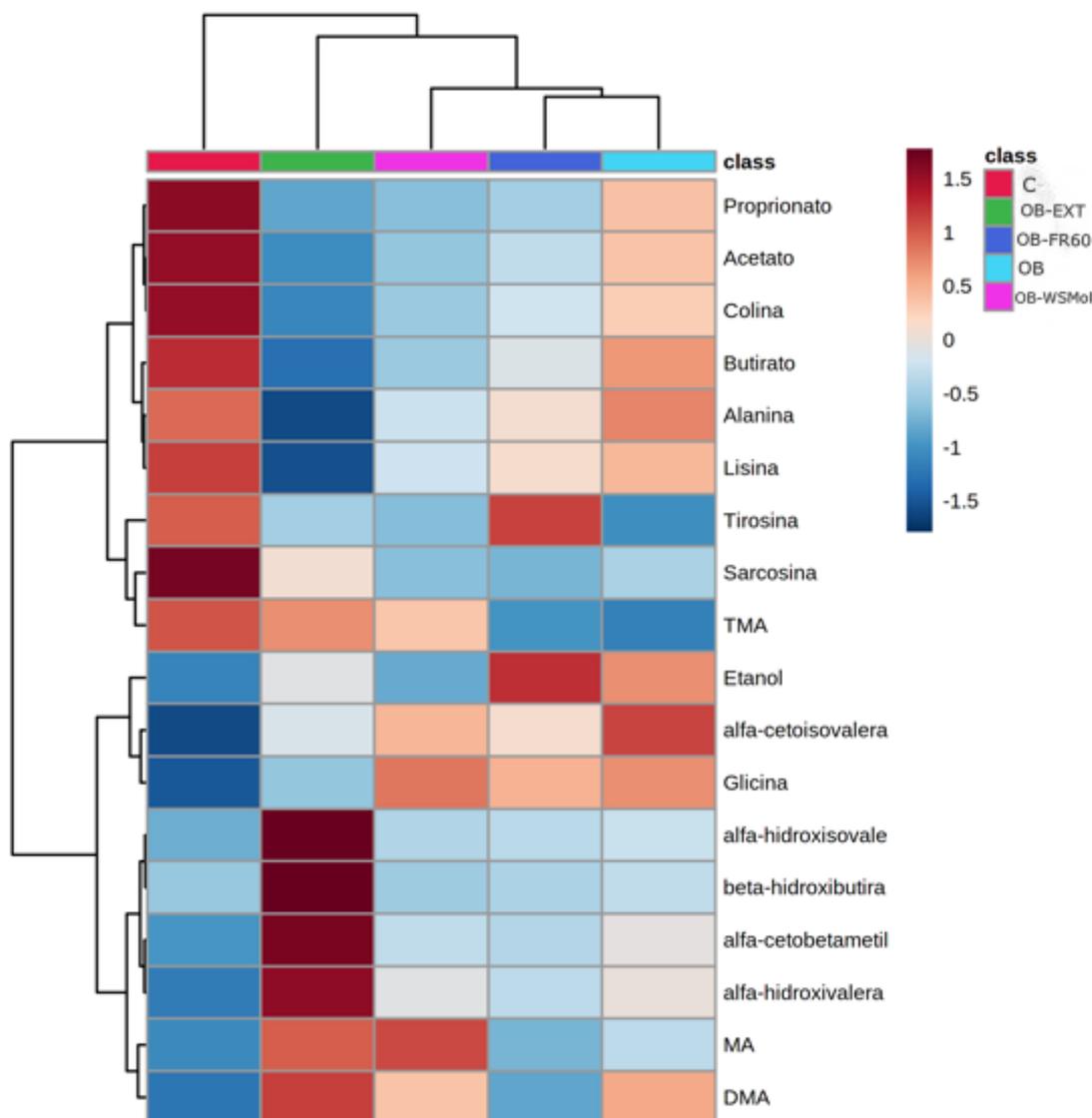


Figura 7. Mapa de calor resumindo mudanças metabólicas dinâmicas em dados espectrais de RMN-1H de extratos fecais. Vermelho indica concentrações mais altas de metabólitos e azul indica concentrações mais baixas de metabólitos.

4. Discussão

Uma combinação de fatores ambientais, incluindo dieta com alto teor de gordura, tem levado ao aumento dramático na incidência de obesidade e seus distúrbios metabólicos associados (Chu et al., 2017; Tsai et al., 2015). Nesse estudo o ganho de peso corporal foi significativamente aumentado em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (OB) em comparação aos camundongos alimentados com ração padrão (C). O uso de EXT, FR60 e WSMoL por 30 dias em camundongos OB não foi capaz de reduzir o ganho de peso (Figuras 1A e 1B). Contudo a tolerância a glicose, esteatose hepática, o nível de infiltrado inflamatório

no tecido adiposo e os níveis de citocinas pró-inflamatórias que se encontram alterados pela obesidade foram significativamente melhorados com o uso dessas preparações. Um estudo recente mostrou que extrato vegetal rico em polifenol (Active XXS inside® - 21560 Couternon, França) normalizou os parâmetros de lipídios e LPS plasmáticos, evitou o recrutamento de macrófagos e reduziu o colesterol e o acúmulo de óxido de colesterol no tecido adiposo, e aumentou a expectativa de vida em camundongos obesos, embora não tenha promovido redução significativa de peso corporal (Aires et al., 2019).

A obesidade está associada a redução na tolerância à glicose, resistência à insulina e desenvolvimento de DM2 (Shalitin and Moreno, 2018). Compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas, incluindo terpenos, alcaloides, polifenóis e flavonoides, têm sido hábeis em normalizar a glicemia, estimular a liberação de insulina, reduzir a resistência à insulina e melhorar a tolerância à glicose (Kim, Keogh, e Clifton 2016; Li et al. 2004). Embora tenha sido dado bastante crédito a estes metabólitos secundários de extratos vegetais por esse efeito hipoglicemiante, pouca atenção tem sido dada as propriedades antidiabéticas de proteínas vegetais presentes nesses extratos e a possibilidade de seu uso para tratamento do diabetes. As proteínas, podem modular o metabolismo dos glicídios melhorando a tolerância à glicose (Paula et al., 2017). Em nosso estudo camundongos obesos tratados por 30 dias com 40 mg/kg de FR60, uma fração rica em proteínas, apresentaram redução significativa nos níveis glicêmicos, revertendo a intolerância à glicose induzida por uma dieta rica em gordura. Um estudo anterior, utilizando administração de 100 mg/kg de fração proteica obtida da casca das sementes de *M. oleifera* por via intraperitoneal ou oral em dose única, mostrou uma redução significativa nos níveis plasmáticos de glicose e melhora na tolerância à glicose em modelo de diabetes tipo 1 (Paula et al., 2017). Já foi relatado que frações proteicas e proteínas isoladas de vegetais promoveram inibição da gliconeogênese hepática através da ativação da via AMPK ou pela sua ligação ao receptor de insulina estimulando a captação de glicose (Oliveira et al. 2019; Lo et al. 2017). Aqui mostramos que EXT e a lectina WSMoL não promoveram melhora na tolerância à glicose, contudo a FR60 reverteu a intolerância à glicose em camundongos obesos. Esse efeito da FR60 pode ser explicado pela sua capacidade em reduzir os níveis de TNF- α , uma importante citocina associada ao desenvolvimento de resistência à insulina; diminuir o acúmulo de lipídeo hepático e de infiltrado inflamatório no tecido

adiposo. Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais a FR60 melhora a tolerância à glicose nesse modelo precisam ser futuramente investigados.

Uma das características mais comuns induzidas pela obesidade é a inflamação crônica de baixo grau (Kalupahana et al., 2012; Wensveen et al., 2015). Logo, investigamos o efeito das preparações de *M. oleifera* sobre o perfil inflamatório, e todos os camundongos OB tratados com EXT, FR60 e WSMoL tiveram uma diminuição significativa nos níveis circulantes de TNF- α e INF- γ . Araújo et al. (2013) já haviam demonstrado que tratamento oral em dose única nas concentrações de 250 e 500 mg/kg de peso corporal do extrato aquoso de semente de *M. oleifera* reduziu os níveis séricos de TNF- α e a migração de leucócitos em um modelo in vivo de pleurisia. Nesse mesmo estudo macrófagos estimulados in vitro com LPS tiveram os níveis de NO e TNF- α reduzidos pelo extrato aquoso e pela lectina WSMoL. Nosso estudo é o primeiro a mostrar o efeito anti-inflamatório de preparações obtidas de sementes de *M. oleifera* em um modelo in vivo de inflamação sub-clínica crônica induzida pela obesidade, o que justifica seu potencial uso para tratamento dessa condição clínica.

Análise histológica do fígado e tecido adiposo confirmam o benefício do EXT e FR60 e WSMoL na melhora da condição da obesidade e de suas complicações. Componentes bioativos, como flavonoides, glicosídeos fenólicos, glucosinolatos e polifenóis presentes nas sementes de *M. oleifera* estão associados a efeitos antioxidante e hepatoprotetor (Araújo et al. 2013; Vergara-Jimenez, Almatrafi, e Fernandez 2017). Sun et al. (2019) mostraram que um glicolídeo fenólico, o 1-O-(4-hydroxymethylphenyl)- α -L-rhamnopyranoside, presente nas sementes de *M. oleifera*, aliviou significativamente a hepatotoxicidade induzida por CCl₄ em camundongos, além disso, reduziu os níveis de peroxidação lipídica e regulou as citocinas inflamatórias. Em outro estudo, extrato de sementes de *M. oleifera*, rico em polifenóis, exibiu poder antioxidante por neutralizar a geração de ROS em camundongos Swiss alimentados com dieta com alto teor de gordura.

Nas últimas décadas estudos relataram que distúrbios metabólicos e inflamação induzidos por dieta rica em gordura estão intimamente relacionados a alterações na microbiota intestinal (Daniel et al., 2014; Wang, J.J. et al., 2015). Aqui mostramos que camundongos obesos tratados com EXT, FR60 e WSMoL, apresentaram uma redução significativa nos níveis de AGCCs. Estudos em animais sugerem que esses ácidos graxos têm um papel importante na prevenção e

tratamento de obesidade associada a resistência à insulina (den Besten et al., 2015; Mollica et al., 2017, 2017; Sahuri-Arisoylu et al., 2016). Além disso, há evidências em humanos para um efeito benéfico deles no controle do peso corporal, estado inflamatório e sensibilidade à insulina, bem como manutenção da homeostase glicídica e lipídica (Canfora et al., 2017; Chambers et al., 2018, 2015). Análises de amostras fecais tem demonstrado aumento de AGCCs em indivíduos obesos em comparação a indivíduos magros (Kim et al., 2019; Schwartz et al., 2010). de la Cuesta-Zuluaga et al., 2018 foram os primeiros a mostrar uma correlação positiva entre altos níveis fecais de AGCCs e aumento de permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica (de la Cuesta-Zuluaga et al., 2018). Em nosso estudo a redução de AGCCs nas fezes de camundongos obesos tratados com as preparações de semente de *M. oleifera* pode estar associada a melhora na disfunção da barreira intestinal induzida por dieta hiperlipídica, promovendo dessa forma uma absorção mais eficiente de AGCCs. Outra hipótese seria que EXT, FR60 e WSMoL de sementes de *M. oleifera* promoveram uma reconstituição da microbiota intestinal que se encontra alterada no estado de obesidade (Fasano, 2017; Moreno-Navarrete et al., 2012) e dessa forma contribuiu para normalização da absorção de AGCCs pelo colón distal, reduzindo sua excreção.

O etanol é um metabólito microbiano derivado da fermentação sacarolítica. Indivíduos com DHGNA e obesidade mostram aumento da abundância de bactérias produtoras de etanol nas fezes, bem como maiores concentrações de etanol na circulação sistêmica e na respiração (Nair et al., 2001; Zhu et al., 2016, 2013). O etanol derivado de bactérias intestinais (ou o metabólito oxidado acetaldeído) está possivelmente envolvido na progressão da DHGNA por efeitos tóxicos diretos nas células hepáticas (Baker et al., 2010; Xu et al., 2011), bem como através do comprometimento na função da barreira intestinal, resultando em aumento da endotoxemia (Rao et al., 2004). Nesse estudo mostramos que camundongos obesos tratados com EXT e WSMoL apresentaram redução significativa nos níveis de etanol fecal o que colabora com a melhora no quadro de esteatose hepática observada nas análises histológicas desses grupos.

Análise dos níveis fecais da TMA, metabólito derivado do metabolismo da colina, mostrou-se reduzida no grupo OB. A TMA é absorvida no intestino, entrando na circulação sanguínea e seguindo para o fígado, onde será oxidada por enzimas hepáticas flavinas mono-oxidases (FMO) em TMAO. Esta última pode ser liberada

pelo fígado e ser absorvida pelos tecidos extra-hepáticos ou ser excretada pela urina, pelo suor ou pela respiração. É também absorvida pelos macrófagos no processo de formação da placa aterosclerótica e assim elevados níveis de TMAO estão associados a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. Aumento plasmático de TMAO em obesos está associado a intolerância à glicose, DHGNA e resistência à insulina (AHMAD et al., 2017). No presente estudo, a redução do nível de TMA fecal em camundongos obesos provavelmente resultou do seu transporte mais eficiente para o fígado suportado pelo aumento nos níveis plasmáticos desse metabólito em animais alimentados com dieta hiperlipídica (An et al., 2013). Por outro lado, o tratamento de camundongos obesos com EXT e WSMoL aumentaram a excreção fecal desse metabólito.

A microbiota colônica distal usa principalmente peptídeos e proteínas residuais para obter energia (fermentação proteolítica) porque seu combustível preferido, carboidratos fermentáveis, já é utilizado no cólon mais proximal (Windey et al., 2012). Em indivíduos obesos foi evidenciado aumento plasmático de aminoácidos aromáticos (ALLAM-NDOUL et al., 2015; LIU et al., 2017) . Aqui mostramos uma redução nos níveis fecais de tirosina nos grupos OB, OB-EXT e OB-WSMoL e um aumento significativo no grupo OB-FR60. É importante destacar que aumento nos níveis plasmáticos e não nos níveis fecais de aminoácidos aromáticos estão fortemente associados com resistência à insulina e obesidade, e os mecanismos relacionados a essas alterações são principalmente pela ativação de um estado pró-inflamatório (Haufe et al., 2016).

O conjunto de dados mostra que preparações obtidas de sementes de *M. oleifera* apresentam interessante potencial para tratamento de distúrbios metabólicos associados a obesidade, uma vez que modulam a produção de metabólitos microbianos, reduzem a inflamação e o acúmulo de gordura hepática, e melhoram a tolerância à glicose em camundongos obesos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo o apoio financeiro. MKST gostaria de agradecer à FACEPE (IBPG-0467-2.08 / 17) pela Bolsa de estudos do doutorado.

Referências

Aires, V., Labbé, J., Deckert, V., Pais de Barros, J.-P., Boidot, R., Haumont, M., Maquart, G., Le Guern, N., Masson, D., Prost-Camus, E., Prost, M., Lagrost, L., 2019. Healthy adiposity and extended lifespan in obese mice fed a diet supplemented with a polyphenol-rich plant extract. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45600-6>

Ajibola, M., Eunice, O., Stephanie, I.N., 2014. Effects of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Seeds on Alloxan Induced Hyperglycemia. *Basic Sciences of Medicine* 3, 37–42.

Al-Waiz, M., Mikov, M., Mitchell, S.C., Smith, R.L., 1992. The exogenous origin of trimethylamine in the mouse. *Metabolism* 41, 135–136. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(92\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0026-0495(92)90140-6)

Amaglo, N.K., Bennett, R.N., Lo Curto, R.B., Rosa, E.A.S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Curto, A.L., Crea, F., Timpo, G.M., 2010. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry* 122, 1047–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.073>

An, Y., Xu, W., Li, H., Lei, H., Zhang, L., Hao, F., Duan, Y., Yan, X., Zhao, Y., Wu, J., Wang, Y., Tang, H., 2013. High-Fat Diet Induces Dynamic Metabolic Alterations in Multiple Biological Matrices of Rats. *J. Proteome Res.* 12, 3755–3768. <https://doi.org/10.1021/pr400398b>

Araújo, J.R., Tomas, J., Brenner, C., Sansonetti, P.J., 2017. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie, Microbe and Host Lipids Gerli Meeting* 141, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.019>

Araújo, L.C.C., Aguiar, J.S., Napoleão, T.H., Mota, F.V.B., Barros, A.L.S., Moura, M.C., Coriolano, M.C., Coelho, L.C.B.B., Silva, T.G., Paiva, P.M.G., 2013a. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PLoS ONE* 8, e81973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081973>

Araújo, L.C.C., Aguiar, J.S., Napoleão, T.H., Mota, F.V.B., Barros, A.L.S., Moura, M.C., Coriolano, M.C., Coelho, L.C.B.B., Silva, T.G., Paiva, P.M.G., 2013b. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PLoS ONE* 8, e81973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081973>

Baker, S.S., Baker, R.D., Liu, W., Nowak, N.J., Zhu, L., 2010. Role of Alcohol Metabolism in Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009570>

Bichi, M., 2013. A Review of the applications of *Moringa oleifera* seeds extract in water treatment. *Civ. Environ. Res.* 3, 1–11.

Canfora, E.E., van der Beek, C.M., Jocken, J.W.E., Goossens, G.H., Holst, J.J., Olde Damink, S.W.M., Lenaerts, K., Dejong, C.H.C., Blaak, E.E., 2017. Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: a randomized crossover trial. *Sci Rep* 7, 2360. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02546-x>

Chambers, E.S., Byrne, C.S., Aspey, K., Chen, Y., Khan, S., Morrison, D.J., Frost, G., 2018. Acute oral sodium propionate supplementation raises resting energy expenditure and lipid oxidation in fasted humans. *Diabetes Obes Metab* 20, 1034–1039. <https://doi.org/10.1111/dom.13159>

Chambers, E.S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D.J., Murphy, K.G., Zac-Varghese, S.E.K., MacDougall, K., Preston, T., Tedford, C., Finlayson, G.S., Blundell, J.E., Bell, J.D., Thomas, E.L., Mt-Isa, S., Ashby, D., Gibson, G.R., Kolida, S., Dhillon, W.S., Bloom, S.R., Morley, W., Clegg, S., Frost, G., 2015. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 64, 1744–1754. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307913>

Chu, D.-T., Malinowska, E., Jura, M., Kozak, L.P., 2017. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. *Physiol Rep* 5. <https://doi.org/10.14814/phy2.13093>

Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 77, 934–938. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.022>

Coriolano, M.C., de Santana Brito, J., de Siqueira Patriota, L.L., de Araujo Soares, A.K., de Lorena, V.M.B., Paiva, P.M.G., Napoleao, T.H., Coelho, L.C.B.B., de Melo, C.M.L., 2018. Immunomodulatory Effects of the Water-soluble Lectin from *Moringa oleifera* Seeds (WSMoL) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). *Protein Pept. Lett.* 25, 295–301. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180130141736>

de la Cuesta-Zuluaga, J., Mueller, N.T., Álvarez-Quintero, R., Velásquez-Mejía, E.P., Sierra, J.A., Corrales-Agudelo, V., Carmona, J.A., Abad, J.M., Escobar, J.S., 2018. Higher Fecal Short-Chain Fatty Acid Levels Are Associated with Gut Microbiome Dysbiosis, Obesity, Hypertension and Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11010051>

de Oliveira, K.A., Moreira Gomes, M.D., Vasconcelos, R.P., de Abreu, E.S., Fortunato, R.S., Carneiro Loureiro, A.C., Coelho-de-Souza, A.N., de Oliveira, R.S.B., de Freitas, C.D.T., Ramos, M.V., de Oliveira, A.C., 2019. Phytomodulatory proteins

promote inhibition of hepatic glucose production and favor glycemic control via the AMPK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109, 2342–2347. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.139>

den Besten, G., Bleeker, A., Gerding, A., van Eunen, K., Havinga, R., van Dijk, T.H., Oosterveer, M.H., Jonker, J.W., Groen, A.K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M., 2015. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* 64, 2398–2408. <https://doi.org/10.2337/db14-1213>

Ejtahed, H.-S., Soroush, A.-R., Siadat, S.-D., Hoseini-Tavassol, Z., Larijani, B., Hasani-Ranjbar, S., 2019. Targeting obesity management through gut microbiota modulation by herbal products: A systematic review. *Complement Ther Med* 42, 184–204. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.11.019>

Fasano, A., 2017. Gut permeability, obesity, and metabolic disorders: who is the chicken and who is the egg? *Am J Clin Nutr* 105, 3–4. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.148338>

Ferreira, P.M.P., Farias, D.F., Oliveira, J.T. de A., Carvalho, A. de F.U., 2008. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. *Revista de Nutrição* 21, 431–437. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732008000400007>

Ferreira, R., Napoleão, T., Santos, A., Sá, R.A., Carneiro-da-Cunha, M., Morais, M., Lucca, R., Oliva, M.L., Coelho, L.C., Paiva, P., 2011. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Letters in applied microbiology* 53, 186–92. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03089.x>

Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., Sanyal, A.J., 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 24, 908–922. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>

Gil-Cardoso, K., Ginés, I., Pinent, M., Ardévol, A., Terra, X., Blay, M., 2017. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br. J. Nutr.* 117, 218–229. <https://doi.org/10.1017/S0007114516004608>

Green, A.A., Hughes, W.L., 1955. [10] Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents, in: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 67–90. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01014-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01014-8)

Haufe, S., Witt, H., Engeli, S., Kaminski, J., Utz, W., Fuhrmann, J.C., Rein, D., Schulz-Menger, J., Luft, F.C., Boschmann, M., Jordan, J., 2016. Branched-chain and aromatic amino acids, insulin resistance and liver specific ectopic fat storage in overweight to obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26, 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.013>

Ijarotimi, O.S., Adeoti, O.A., Ariyo, O., 2013. Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Sci Nutr* 1, 452–463. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70>

Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N., Claycombe, K.J., 2012. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 33, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.011>

Kim, K.N., Yao, Y., Ju, S.Y., 2019. Short Chain Fatty Acids and Fecal Microbiota Abundance in Humans with Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11102512>

Kim, Y., Keogh, J.B., Clifton, P.M., 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients* 8. <https://doi.org/10.3390/nu8010017>

Li, H., Yu, X., 2013. Emerging role of JNK in insulin resistance. *Curr Diabetes Rev* 9, 422–428.

Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J., De Kimpe, N., 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 92, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.031>

Lin, H., An, Y., Hao, F., Wang, Y., Tang, H., 2016. Correlations of Fecal Metabonomic and Microbiomic Changes Induced by High-fat Diet in the Pre-Obesity State. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep21618>

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.

Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>

Mollica, M.P., Mattace Raso, G., Cavaliere, G., Trinchese, G., De Filippo, C., Aceto, S., Prisco, M., Pirozzi, C., Di Guida, F., Lama, A., Crispino, M., Tronino, D., Di Vaio, P., Berni Canani, R., Calignano, A., Meli, R., 2017. Butyrate Regulates Liver Mitochondrial Function, Efficiency, and Dynamics in Insulin-Resistant Obese Mice. *Diabetes* 66, 1405–1418. <https://doi.org/10.2337/db16-0924>

Moreno-Navarrete, J.M., Sabater, M., Ortega, F., Ricart, W., Fernández-Real, J.M., 2012. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PLoS ONE* 7, e37160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037160>

Moura, M.C., Napoleão, T.H., Coriolano, M.C., Paiva, P.M.G., Figueiredo, R.C.B.Q., Coelho, L.C.B.B., 2015. Water-soluble Moringa oleifera lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 119, 666–676. <https://doi.org/10.1111/jam.12882>

Moura, M.C., Trentin, D.S., Napoleão, T.H., Primon-Barros, M., Xavier, A.S., Carneiro, N.P., Paiva, P.M.G., Macedo, A.J., Coelho, L.C.B.B., 2017. Multi-effect of the water-soluble Moringa oleifera lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. *J. Appl. Microbiol.* 123, 861–874. <https://doi.org/10.1111/jam.13556>

Nair, S., Cope, K., Risby, T.H., Diehl, A.M., Terence, R.H., 2001. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1200–1204. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03702.x>

Netto Candido, T.L., Bressan, J., Alfenas, R. de C.G., 2018. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. *Nutr Hosp* 35, 1432–1440. <https://doi.org/10.20960/nh.1792>

Nguyen, M.T.A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P.A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C.K., Neels, J.G., Olefsky, J.M., 2007. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 35279–35292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706762200>

Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol* 36, 113–118. <https://doi.org/10.1007/BF02929691>

Parnell, J.A., Raman, M., Rioux, K.P., Reimer, R.A., 2012. The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance. *Liver Int.* 32, 701–711. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02730.x>

Paula, P.C., Oliveira, J.T.A., Sousa, D.O.B., Alves, B.G.T., Carvalho, A.F.U., Franco, O.L., Vasconcelos, I.M., 2017. Insulin-like plant proteins as potential innovative drugs to treat diabetes-The *Moringa oleifera* case study. *N Biotechnol* 39, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.10.005>

Rao, R.K., Seth, A., Sheth, P., 2004. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G881-884. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00006.2004>

Rebollo-Hernanz, M., Zhang, Q., Aguilera, Y., Martín-Cabrejas, M.A., Gonzalez de Mejia, E., 2019. Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways. *Food and Chemical Toxicology* 132, 110672. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110672>

Sahuri-Arisoylu, M., Brody, L.P., Parkinson, J.R., Parkes, H., Navaratnam, N., Miller, A.D., Thomas, E.L., Frost, G., Bell, J.D., 2016. Reprogramming of hepatic fat accumulation and “browning” of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *Int J Obes (Lond)* 40, 955–963. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.23>

Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N.A., Donus, C., Hardt, P.D., 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18, 190–195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>

Shalitin, S., Moreno, L.A., 2018. Obesity, Metabolic Syndrome and Nutrition. *World Rev Nutr Diet* 117, 15–38. <https://doi.org/10.1159/000484498>

Suk, K.T., Kim, D.J., 2019. Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 193–204. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1569513>

Sun, C., Li, W., Liu, Y., Deng, W., Adu-Frimpong, M., Zhang, H., Wang, Q., Yu, J., Xu, X., 2019. In vitro/in vivo hepatoprotective properties of 1-O-(4-hydroxymethylphenyl)- α -L-rhamnopyranoside from *Moringa oleifera* seeds against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110531. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.039>

Tong, X., Xu, J., Lian, F., Yu, X., Zhao, Y., Xu, L., Zhang, M., Zhao, X., Shen, J., Wu, S., Pang, X., Tian, J., Zhang, C., Zhou, Q., Wang, L., Pang, B., Chen, F., Peng, Z., Wang, J., Zhen, Z., Fang, C., Li, M., Chen, L., Zhao, L., 2018. Structural Alteration of Gut Microbiota during the Amelioration of Human Type 2 Diabetes with Hyperlipidemia by Metformin and a Traditional Chinese Herbal Formula: a Multicenter, Randomized, Open Label Clinical Trial. *mBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02392-17>

Tsai, S., Clemente-Casares, X., Revelo, X.S., Winer, S., Winer, D.A., 2015. Are obesity-related insulin resistance and type 2 diabetes autoimmune diseases? *Diabetes* 64, 1886–1897. <https://doi.org/10.2337/db14-1488>

Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M.M., Fernandez, M.L., 2017. Bioactive Components in *Moringa Oleifera* Leaves Protect against Chronic Disease. *Antioxidants* 6, 91. <https://doi.org/10.3390/antiox6040091>

Wensveen, F.M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T., Polić, B., 2015. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur. J. Immunol.* 45, 2446–2456. <https://doi.org/10.1002/eji.201545502>

Windey, K., Preter, V.D., Verbeke, K., 2012. Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 184–196. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100542>

Xu, J., Lai, K.K.Y., Verlinsky, A., Lugea, A., French, S.W., Cooper, M.P., Ji, C., Tsukamoto, H., 2011. Synergistic steatohepatitis by moderate obesity and alcohol in mice despite increased adiponectin and p-AMPK. *Journal of Hepatology* 55, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.12.034>

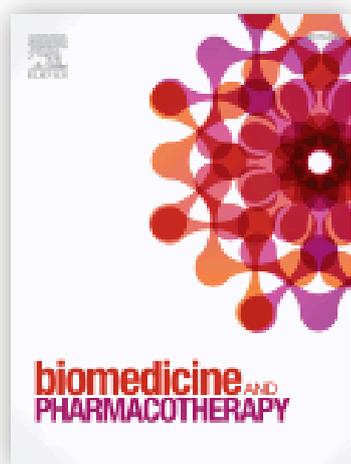
Zhang, X., Xu, A., Chung, S.K., Cresser, J.H.B., Sweeney, G., Wong, R.L.C., Lin, A., Lam, K.S.L., 2011. Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. *Diabetes* 60, 486–495. <https://doi.org/10.2337/db10-0650>

Zhu, L., Baker, R.D., Zhu, R., Baker, S.S., 2016. Gut microbiota produce alcohol and contribute to NAFLD. *Gut* 65, 1232. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311571>

Zhu, L., Baker, S.S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R.D., Gill, S.R., 2013. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 57, 601–609. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>

4.3 Potencial anti-obesogênico da *Moringa oleifera*: uma revisão sistemática

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Biomedicine & Pharmacotherapy”



Fator de Impacto: 4.545

Potencial anti-obesogênico da *Moringa oleifera*: uma revisão sistemática

Marília Kalinne da Silva Torres¹, Matheus Santos de Sousa Fernandes², Thiago Henrique Napoleão¹, Bruno de Melo Carvalho³, Patrícia Maria Guedes Paiva¹

1 Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

2 Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Brasil

3 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

***Autor correspondente.** Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

Endereço de e-mail: patricia.paiva@ufpe.br

Resumo

A obesidade decorrente do desequilíbrio na ingestão calórica e gasto energético tem contribuído para o aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica, doença cardíaca coronariana e aterosclerose com consequente aumento na taxa de

mortalidade humana. Este estudo fornece uma visão crítica de estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* que avaliaram a eficácia de *M. oleifera* no controle da obesidade e nas alterações metabólicas relacionadas. Relatamos os efeitos de preparações de folhas e sementes de *M. oleifera* em diferentes modelos e os mecanismos de ação relacionados ao controle da obesidade. No modelo *in vitro*, *M. oleifera* reduziu a absorção de glicose e lipídios ao inibir a α -glicosidase e as lipases pancreáticas, respectivamente. *M. oleifera* também inibiu a diferenciação de adipócitos por meio de diminuição da expressão de PPAR- γ , C/EBP α , C/EBP β , além de induzir apoptose de adipócitos maduros pelo aumento da expressão de BAX e caspase 3. Em modelo *in vivo*, preparações de *M. oleifera* preveniram o ganho de peso, reduziram os níveis plasmáticos de lipídios, citocinas e adipocinas inflamatórias, promoveram aumento de sensibilidade à insulina e modularam a microbiota intestinal de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica. A revisão explicitou o importante impacto de folhas e sementes de *M. oleifera* no tratamento e prevenção da obesidade.

Palavras-chave

Planta; obesidade, inflamação, antiadipogênico, microbioma intestinal

Introdução

A obesidade é um dos principais problemas epidêmicos que ameaçam a saúde mundial e está associada ao desenvolvimento de doenças como hipertensão, doenças cardiovasculares, esteatose hepática não alcoólica, diabetes tipo 2 e carcinogênese (1–4). Globalmente, estima-se que o sobrepeso e a obesidade afetem aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (5). As causas da obesidade são multifatoriais, incluindo fatores genéticos, hormonais e ambientais (6). Atualmente, o consumo de dietas ricas em carboidratos e gorduras, bem como a adoção de um estilo de vida sedentário resultam em um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia e levam ao acúmulo de gordura.

O acúmulo de gordura visceral provoca alterações nos níveis de liberação de adipocinas, decorrentes de distúrbios no metabolismo corporal, incluindo o

desenvolvimento de um estado inflamatório subclínico crônico, resistência à insulina e alterações cardiovasculares (7,8). Nesse sentido, tratamentos para aumentar a atividade física e reduzir a ingestão de calorias para prevenir a disfunção da adiposidade visceral são sempre recomendados, sendo o tratamento farmacológico prescrito como último recurso para pessoas que não respondem às intervenções no estilo de vida. Principalmente dois tipos diferentes de drogas anti-obesogênicas estão atualmente disponíveis no mercado (9); o orlistate, que reduz a absorção intestinal de gordura por meio da inibição da atividade da lipase pancreática (10,11) e a sibutramina, que é um fármaco anorexígeno ou supressor do apetite (12). Foi relatado que os dois medicamentos têm efeitos colaterais, incluindo aumento da pressão arterial, boca seca, constipação, cefaleia e insônia (13–15). Sendo assim, a demanda por medicamentos anti-obesidade naturais tem aumentado nos últimos anos.

Moringa oleifera (*M. oleifera*), pertencente à família Moringaceae, é uma planta nativa da Índia que se encontra distribuída em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo (16). As folhas, flores, frutos, sementes, cascas e raízes da planta têm sido amplamente utilizadas como alimento e medicamento para tratamento de diferentes condições patológicas (17–19). Preparações de *M. oleifera* são usadas por suas atividades anti-inflamatória, anti-hipertensiva, diurética, antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, anti-hiperlipidêmica, antineoplásica, antipirética, antiúlcera, cardioprotetora e hepatoprotetora (20). Estudos em animais usando extratos aquosos, alcoólicos ou hidroalcoólicos de *M. oleifera* demonstraram potente atividade antioxidante, hipocolesterolêmica e antidiabética, melhoraram a dislipidemia e o ganho de peso corporal e modularam a microbiota intestinal na obesidade induzida experimentalmente em roedores (21–23). Outros estudos sugeriram que preparações de *M. oleifera* podem prevenir a obesidade, regulando a expressão de genes que promovem a proliferação e diferenciação de adipócitos (24,25). Também foi relatado que preparações de *M. oleifera* podem inibir o crescimento do tecido adiposo, induzindo enzimas que ativam a captação de glicose e ácidos graxos (25). *M. oleifera* também reduz a absorção intestinal de gordura, demonstrando seu potencial antiadipogênico (26).

A revisão avaliou estudos experimentais realizados *in vitro* e *in vivo* sobre a eficácia antiobesidade de extratos, frações e compostos puros isolados de várias partes de *M. oleifera*.

2. Materiais e métodos

Esta revisão sistemática está de acordo com os Itens de Relatório Preferidos para Revisões Sistemáticas e Meta-análises (PRISMA) (27).

2.1 Estratégia de pesquisa

A busca por estudos na literatura científica teve início em julho de 2020, utilizando as seguintes bases de dados: PubMed, Science Direct e Biblioteca virtual de saúde (BVS). Os termos utilizados na estratégia de busca foram: *Moringa oleifera* e Obesidade. As alterações foram feitas para a estratégia de pesquisa, dependendo do banco de dados usado. Nenhum filtro foi aplicado em relação ao ano de publicação dos estudos.

2.2 Seleção do Estudo

Os artigos foram incluídos se atendessem aos seguintes critérios PICOS (População: Animais; Intervenção / exposição: Administração de *Moringa oleifera*, Resultados: Obesidade; Desenho do Estudo: Estudos em animais) (27). Após a remoção das duplicatas, para determinar a elegibilidade para inclusão na revisão, os títulos e resumos dos estudos identificados foram avaliados por dois revisores independentes usando um critério de inclusão: Texto completo disponível, artigos escritos em inglês, modelos animais (in vivo e em vitro), utilizando diferentes formas de administração de *Moringa oleifera* (folhas, sementes e parte aérea), em diferentes modelos de indução de obesidade. Critérios de exclusão: críticas, opiniões, cartas, outras línguas, estudos com humanos, que não abordassem a obesidade em seus estudos.

2.3 Extração de dados

Os artigos selecionados foram submetidos à segunda etapa de análise, na qual dois outros pesquisadores independentes revisaram os artigos na íntegra e, por consenso, excluíram os artigos que não atendiam aos critérios. Os dados dos artigos

considerados elegíveis foram extraídos quanto ao autor/ano, características da amostra ou modelo, metodologia e principais resultados encontrados. Para estudos de revisão, caso-controle, foram excluídos relatos de casos que não apresentavam dados correspondentes ao sujeito avaliado.

2.4 Risco de viés em estudos com animais

O risco individual de viés foi avaliado pelos autores por meio da ferramenta SYRCLE (28). Em todos os processos descritos acima, quaisquer divergências foram resolvidas por discussão. Entre os critérios que estruturam a avaliação do viés estão: (1). A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? (2). A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? (3). A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? (4). A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? (5). A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? (6). A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente? (7). O avaliador do resultado ficou cego? (8). Os dados de resultados incompletos foram tratados de forma adequada? (9). Os relatórios do estudo são isentos de relatórios de resultados seletivos? (10). O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? (Tabela 1).

Table. 1 Summary of risk of bias assessment

Author, year	Questions									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Balusamy, 2019	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Elham M, 2018	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Fateheja, 2017	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Ganjayi, 2020	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Ghasi, 2000	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Huang, 2020	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Jaja-Chimedza, 2018	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Joung, 2017	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Kim, 2020	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Lamia Mabrouki, 2020	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Muhammad, 2019	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Oyeleye, 2019	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Shahira, 2020	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Waterman, 2015	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low
Xie, 2018	Unclear	Low	Unclear	Unclear	Low	Unclear	Low	Low	Low	Low

1. Was the allocation sequence adequately generated and applied? 2. Was the allocation sequence adequately generated and applied? 3. Was the allocation sequence adequately generated and applied? 4. Was the allocation sequence adequately generated and applied? 5. Was the allocation sequence adequately generated and applied? 6. Was the allocation sequence adequately generated and applied? 7. Was the outcome assessor blinded? 8. Were incomplete outcome data adequately addressed? 9. Are reports of the study free of selective outcome reporting? 10. Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias?

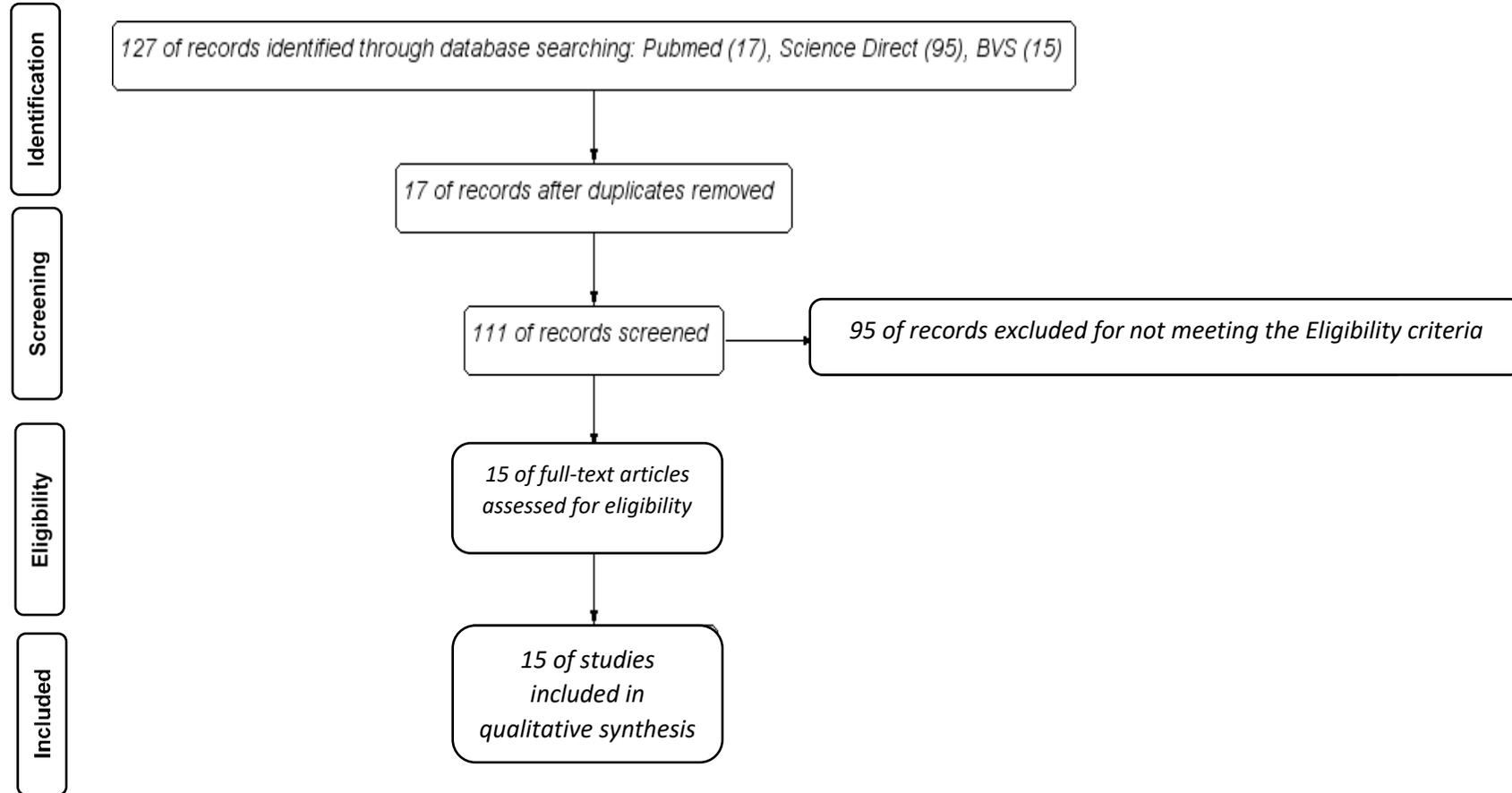
3. Resultados

3.1. Características do estudo

Um total de 127 artigos foi identificado nas bases de dados: Pubmed (17), Science Direct (95) e BVS (15). A seguir, 111 foram excluídos por não apresentarem resultados sobre obesidade ou serem repetições. Em seguida, 15 passaram nos critérios de seleção para revisão e extração de dados (Figura 1). Um dos 15 estudos avaliados foi realizado no ano de 2000, os demais foram executados nos últimos 5 anos.

Os estudos selecionados comprovam que extratos brutos, frações e compostos bioativos, principalmente de folhas e sementes, são capazes de suprimir o apetite, reduzir o acúmulo de gordura corporal, regular o metabolismo de ácidos graxos e carboidratos, modular a microbiota intestinal, melhorar problemas de fígado gorduroso e adipogênese. De acordo com nossa pesquisa, 4 estudos foram realizados *in vitro*, 9 *in vivo* e 2 *in vitro* e *in vivo*. Uma visão geral das principais características dos 15 estudos incluídos está resumida nas Tabelas 2 e 3.

Figure 1. Study flow diagram.



3.2. Evidência das atividades anti-obesidade de *M. oleifera*

3.2.1 Modelo In vitro

3.2.1.1 Inibição de adipogênese e síntese de ácido graxo em células 3T3-L1

A adipogênese é uma das principais vias de aumento da massa de tecido adiposo, por meio do qual os pré-adipócitos amadurecem em adipócitos por meio da diferenciação celular. O receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) ativa a expressão de uma série de genes induzidos durante a diferenciação dos adipócitos, incluindo genes responsáveis pelo acúmulo de lipídeos e sensibilidade à insulina (29). De fato, estudos relatam que uma dieta rica em gordura promove a expansão do tecido adiposo induzida principalmente pela hipertrofia dos adipócitos (30). Nesta revisão, seis estudos avaliaram o papel de *M. oleifera* na adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1 (Tabela 2) (24–29). A determinação do efeito inibitório da adipogênese foi avaliada pela quantificação do teor de triglicerídeos ou glicerol, bem como pela expressão de genes ou proteínas associadas à lipogênese e lipólise.

O tratamento de adipócitos 3T3-L1 com extrato de éter de petróleo da folha de *M. oleifera* (25-400 μg / mL) por 24 horas reduziu o teor de triglicerídeos, a expressão de PPAR γ , proteína de ligação do potenciador CCAAT- α (CEBP α), proteína de ligação do potenciador CCAAT- β (CEBP β) e ácido graxo sintase (FAS) e aumentou a expressão da proteína de lipase triglicéridica adiposa (ATGL), lipase sensível a hormônio (HSL), proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e Acetil-CoA carboxilase (ACC) (31). O extrato aquoso concentrado de folhas de *M. oleifera* (50 μg) reduziu o conteúdo de glicerol em adipócitos 3T3-L1 incubados por 3,5 h (32). Além disso, este estudo mostrou uma redução na expressão de glicose-6-fosfatase (G6PD) e fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) em células de hepatoma de rato H4IIE (32). Extrato etanólico de folhas de *M. oleifera* (100–2000 μg / mL) reduziu a concentração de triglicerídeos de maneira dose-dependente e inibiu a expressão dos genes PPAR γ , CEBP α e FABP4 em adipócitos 3T3-L1 (24). Em outro estudo, quatro diferentes extratos obtidos das folhas de *M. oleifera* (80% da fração extrato etanólico-clorofórmio; 80% da fração extrato etanólico-EtOAc; 80% da fração extrato etanólico-hexano e 80% da fração extrato etanólico-água) em concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ também reduziram o acúmulo de triglicerídeos nas células 3T3-L1 e diminuíram a expressão de PPAR γ FAS e ACC de maneira dose-dependente (26).

Astragalin, um composto isolado do extrato hidroalcoólico de folhas de *M. oleifera*, reduziu o conteúdo de triglicerídeos e o acúmulo de lipídeos nos adipócitos 3T3-L1 e aumentou a liberação de glicerol de maneira dose-dependente, bem como regulou negativamente a expressão gênica de PPAR- γ , CEBP- α , FAS e leptina (25). Isotiocianato de 4- (α -l-ramnosiloxi) benzil, um composto isolado do extrato de semente de *M. oleifera* (100 μ g / mL), reduziu o acúmulo de lipídeos em adipócitos 3T3-L1 (33).

3.2.1.2 Inibição de enzima digestiva

A detecção da atividade inibitória de enzimas digestivas por compostos naturais é um alvo para o tratamento da obesidade. Apenas um estudo avaliou a atividade inibitória de *M. oleifera* sobre as enzimas α -glicosidase e lipase pancreática. Neste estudo, quatro frações etanólicas das folhas de *M. oleifera* inibiram a atividade das enzimas α -glicosidase e lipase pancreática na concentração de 2,5 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente (26). Atualmente, o único medicamento aprovado para o tratamento da obesidade que atua inibindo a atividade das lipases gástricas e pancreáticas é o Orlistate. Pela ação do Orlistate sobre as lipases, mais de 30% das gorduras ingeridas nos alimentos passam pelo trato digestivo sem serem digeridas ou absorvidas (34). Dessa forma, o corpo não pode transformar essas calorias em excesso em tecido adiposo de reserva. As preparações de *M. oleifera*, além do efeito inibitório sobre as lipases, também inibiram as α -glicosidases e, somadas a isso, apresentaram ação antiadipogênica (26).

Table 2. *In vitro* activities of *Moringa oleifera* against obesity.-

Author	Part used	Extract / Fraction / Phytochemical	Dose	<i>In vitro</i> (enzyme inhibition / cell line)	Activity
Balusamy et al., 2019	Leaves	Ethanollic extract / isoquercetin	100–2000 µg/mL	3T3-L1 Pre-adipocyte	↑ BAX; ↓ BCL2; ↑ Caspase 3; ↓ Accumulation of triglyceride content; ↑ Apoptosis in adipocyte cells
Muni Swamy et al., 2020	Leaves	Astragalin	5–30 mg/mL	3T3-L1 Preadipocytes.	↓ Triglycerides content and lipid accumulation, Leptina; ↑ Glycerol release, adiponectin ↓ PPAR-γ, C/EBP-α, FAS.
Waterman et al., 2015	Leaves	Isothiocyanate-rich aqueous extract	10-100 µg	3T3-L1 preadipocytes and H4IIE rat hepatoma cells	↑ Production of glycerol in adipocytes; ↓ Glucose expression of G6P and PEPCK
Xie et al., 2018	Leaves	Petroleum ether extract	25–400 µg/mL	3T3-L1 Preadipocyte	↓ triglyceride content ↑ HSL, AMPK and ACC ↓ PPARγ, C/EBPα, C/EBPβ, FAS
Huang et al., 2020	Seeds	Isothiocyanate	100 µg/mL	3T3-L1 Preadipocytes.	↓ Lipid accumulation
Kim et al., 2020	Leaves	Ethanollic extract-chloroform fraction; Ethanollic extract-EtOAc fraction; Ethanollic extract-hexane fraction Ethanollic extract-water fraction	25 to 100 µg/mL	Enzyme inhibition / 3T3-L1 Preadipocytes	Inhibition enzymes α-glycosidase and pancreatic lipase; ↓ Triglycerides; ↓ PPARγ FAS and ACC

ATGL, Adipose triglyceride lipase; BAX, BCL-2-associated protein X; BCL2, B-cell lymphoma protein 2; PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase; C/EBP-α, CCAAT enhancer binding protein-α; PPAR-γ, peroxisome; proliferator-activated receptor-γ; FAS, fatty acid synthase, HSL, hormone-sensitive lipase; AMPK, AMP-activated protein kinase; ACC, Acetyl-CoA carboxylase; G6P, glucose-6-phosphatase.

3.2.2 Modelo Animal

3.2.2.1 Efeitos de *M. oleifera* no acúmulo de lipídios, inflamação e sensibilidade à insulina em modelos animais de obesidade

O potencial anti-obesogênico de *M. oleifera* foi estudado in vivo usando modelos de obesidade induzida por dieta em animais (Tabela 3). A administração oral por 30 dias (1 mg/g de peso corporal) do extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* diminuiu os níveis de colesterol sérico, hepático e renal em ratos Wistar machos obesos induzidos por dieta hiperlipídica (HFD) (35). O extrato aquoso de folhas de *M. oleifera* na dose de 200 mg/kg de peso corporal administrado por via oral por 3 meses reduziu o peso, colesterol no sangue, triglicerídeos, LDL e melhorou HDL em camundongos Swiss jovens obesos induzidos por HFD de ambos os sexos (36). A dieta com alto teor de gordura (VHFD) suplementada com 5% de extrato aquoso de folhas rico em isotiocianato por 12 semanas diminuiu o peso corporal, a massa de gordura corporal, os perfis lipídicos e regulou negativamente a atividade de FAS, SREBP1c e FSP27 em camundongos C57BL/6J (32). Neste estudo, também foi demonstrado que *M. oleifera* reduziu os níveis plasmáticos de insulina, leptina, resistina e níveis de glicose no sangue, e os efeitos foram associados a redução nos marcadores inflamatórios, IL-1 β , TNF α , IL-6 e aumento nas proteínas associadas à via de sinalização da insulina, IRS-1p, IRS-1 PI-3K, Akt1p, Akt2p e GLUT4 no fígado e músculo (32). O extrato fermentado de folhas de *M. oleifera* administrado na dose de 250 mg/kg de peso corporal por via oral por 10 semanas não alterou o peso corporal, porém reduziu o peso do fígado e a adiposidade hepática, MCP1, TNF α , IL-6, IL-12 e IL-1 β , melhorou a tolerância à glicose e promoveu regulação negativa da expressão de CD36, ACOX1, ATGL, HSL, LPL ACC, FAS, SREBP1c, C/EBP α , PPAR γ , CPT1, PPAR α , BiP, PDI, CHOP, UCP2 e UCP3 (37). A suplementação de extrato de semente de *M. oleifera* contendo 47% de 4-[(α -L-rhamnosiloxi) benzil] isotiocianato (MIC-1) na dieta hiperlipídica de camundongos machos C57BL/6J por 12 semanas diminuiu a adiposidade, melhorou a tolerância à glicose, reduziu a expressão de genes inflamatórios e aumentou a expressão de iNOS (23).

O extrato de éter de petróleo das folhas de *M. oleifera* (MOPPE) (0,5 g/kg de peso corporal) reduziu efetivamente o peso corporal, peso relativo da gordura epididimal, perirrenal e mesentérica e tamanho do tecido adiposo e acúmulo de

gordura hepática em camundongos HFD (31). Além disso, MOPPE reduziu significativamente os níveis séricos de colesterol total, colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e aspartato aminotransferase (AST), regulou negativamente a expressão de proteínas associadas à adipogênese (PPAR γ e FAS), regulou positivamente a expressão de uma proteína associada à lipólise [lipase de triglicerídeo adiposo (ATGL)] no tecido adiposo hepático e epididimal e aumentou significativamente o grau de fosforilação de AMPK α e ACC no tecido adiposo hepático e epididimal (31). O extrato metanólico de folhas de *M. oleifera* na dose de 200 mg/kg e 400 mg/kg de peso corporal administrado por via oral a ratos obesos por 12 semanas levou a diminuição no ganho de peso corporal, colesterol total e triglicerídeos e aumentou os níveis de HDL-C; além disso, equilibrou o estado antioxidante e restaurou a estrutura histológica normal do coração (38). A administração de cubos de gelatina contendo 400 mg/kg de peso corporal de extrato metanólico de folhas de *M. oleifera* em ratas Sprague Dawley com obesidade induzida por frutose levou a redução no acúmulo de lipídios hepáticos (39).

Estudo com camundongos Swiss machos com obesidade induzida por HFD tratados com uma dose de 400 mg/kg de peso corporal por 1 mês com extrato etanólico de folhas de *M. oleifera* revelou efeito proeminente na redução do peso corporal e índice de adiposidade, redução nos níveis de glicose, insulina, HOMA-IR e leptina e vaspina no tecido, aumento da expressão de adiponectina, omentina, GLUT-4 e mRNA de MC4R e PPAR- α e que FAS e HMG-CoA redutase foram significativamente suprimidos (22). Em outro estudo, o extrato etanólico das partes aéreas de *M. oleifera* foi administrado por via oral na dose de 600 mg/kg de peso corporal em ratas Wistar fêmeas com dieta rica em colesterol (DCH) por 12 semanas. Os resultados mostraram que o extrato regulou negativamente a expressão do mRNA de leptina e resistina, enquanto regulou positivamente a expressão do gene da adiponectina; o que refletiu na redução do peso corporal e melhora do índice aterogênico e do índice da artéria coronária, bem como do nível de glicose e da resistência à insulina (21). Ratos Wistar machos adultos alimentados com suplementação de HCD com 2 e 4% de folhas de rábano e sementes de *M. oleifera* diminuíram as atividades da enzima conversora de angiotensina-I (ACE) e arginase, colesterol, triglicerídeos e LDL-C e aumentaram os níveis de HDL-C (40).

3.2.2.2 Efeito de *M. oleifera* na regulação da microbiota intestinal

Em resposta a uma dieta com alto teor de gordura, vários estudos mostraram mudanças importantes na composição da microbiota intestinal que foram correlacionadas com mudanças na função da barreira intestinal, resposta inflamatória aumentada e o desenvolvimento de resistência à insulina. Nesse sentido, apenas dois estudos incluídos nesta revisão avaliaram os efeitos de *M. oleifera* na modulação da microbiota intestinal em camundongos obesos induzidos por HFD. O extrato da semente de *M. oleifera* enriquecido com isotiocianatos de moringa (MIC) reduziu o peso corporal, adiposidade e aumentou a tolerância à glicose, e foi detectado uma abundância relativa proeminentemente menor de Actinobacteria e Bacteroidetes e maior abundância de Proteobacteria (23). No outro estudo, mostrou que camundongos Swiss obesos induzidos por HFD tratados por três meses com o extrato aquoso da folha de *M. oleifera*, apresentaram redução no peso corporal, níveis de colesterol, triglicerídeos, LDL-c e HDL-c, diminuição nas concentrações de Lactobacillus e aumento de Bifidobactérias do intestino (36).

Table 3. *In vivo* studies of potential *Moringa oleifera* against obesity.

Author	Part used	Extract / Fraction / Phytochemical	Dose / treatment duration	<i>In vivo</i> (experimental model)	Activity
Ghasi et al., 2000	Leaves	Aqueous extract	1 mg/g body weigh / oral administration for 30 days.	HFD-induced obese male Wistar rats / Does not inform old	↓ serum, liver, and kidney cholesterol levels;
Waterman et al., 2015	Leaves	Isothiocyanate-rich aqueous extract	VHFD supplemented with 5% moringa concentrate (MC, delivering 66 mg/kg/d of MICs) / 12 weeks.	VHFD-induced obese male C57BL/6J mice / 5 weeks old	↓ Body weight; <-> food consumption; ↓ Fat accumulation and ↑ lean mass; ↓ Blood glucose levels in OGTT; ↓ livers weighed and levels of lipids; ↓ Blood plasma levels of insulin, leptin, resistin, IL-1β, TNFα and cholesterol; ↑ IRS-1p, IRS-1 PI-3K, Akt1p and Akt2p in liver and IRS-1p, IRS-1, IRS-2, IRβ, Akt1 and GLUT4 in muscle; ↓ gene expression of TNFα, IL-6, IL-1β in the liver and Ileum tissue; ↓ gene expression of TNFα and ↑ adiponectin in adipose tissue; ↑ gene expression of PRDM16, ADRB3, PGC-1α, but ↓ expression of UCP1 in the Inguinal adipose tissues; ↓ gene expression of GcK, protein levels of FAS, SREBP1c, and FSP27 and ↑ levels of ATGL.
Joung et al., 2017	Leaves	Fermented extract	250 mg/kg body weight in 150 μL distilled water / oral administration for	HFD-induce obese male C57BL/6J mice / 4 weeks old	<-> Body weight; ↓ liver weight; ↑ gucose tolerance ↓ hepatic adiposity; ↓ CD36, ACOX1, ATGL, HSL, LPL ACC, FAS, SREBP1c C/EBPα,

			10 weeks		PPARY, CPT1, PPAR α , BiP, PDI, CHOP, UCP2 and UCP3; \uparrow AMPK and pAMPK; \leftrightarrow TRB3; \downarrow MCP1, TNF α , IL-6, L-12 and IL-1 β
Elabd et al., 2018	Leaves	Aqueous extract	200 mg/Kg body weight / administered orally for 3 months.	HFD-induced obese young Swiss albino mice of either sex / Does not inform old	\downarrow Body weight, blood cholesterol, triglycerides, LDLc., \leftrightarrow IL-6; \uparrow HDLc \downarrow Lactobacillus \uparrow Bifidobacteria
Jaja-Chimedza et al., 2018	Seed	Hydroalcoholic extract (MSE) containing 47% of its primary bioactive compound, MIC-1	VHFD supplemented with 0.25% MIC-1 (0.54% MSE) / 12 weeks	VHFD-induced obese C57BL/6J mice / 5 weeks old	\downarrow Body weight, adiposity and iNOS); \uparrow glucose tolerance and NQO1; \leftrightarrow IL-1 β , IL-6 and TNF- α ; \downarrow bacterial α diversity; \downarrow Actinobacteria, \downarrow Bacteroidetes; \uparrow Proteobacteria
Xie et al., 2018	Leaves	Petroleum ether extract	0,125 g/kg; 0,25 g/kg, 0,5 g/kg body weight /oral gavage for 14 weeks	HFD- induce obese male C57BL/6J mice / 7 weeks old	\downarrow Body weight, relative epididymal, perirenal, and mesenteric fat weight and fat tissue size, and hepatic fat accumulation; \downarrow serum levels of cholesterol, LDL-C and AST; \leftrightarrow serum level of triglycerides and HDL-C; \downarrow proteins PPAR γ and FAS; \uparrow ATGL; \uparrow AMPK α and ACC
Mabrouki et al., 2020	Leaves	Methanolic extract	200 mg/kg/bw and 400 mg/kg body weight / orally administrated for 12 weeks	HFD-induced obesity male Wistar rats / 3-month-old	\downarrow body weight gain, feed efficiency ratio levels, cholesterol, triglycerides, CK-MB, AST, ALT; \uparrow HDL-C; TBARS, GPx, CAT, SOD, cardiac TSH; \downarrow inflammatory cell collections and absence of necrosis areas in the heart.
Muhammad et al., 2019	Leaves	Methanolic extract	Gelatine cubes with 400 mg/kg	fructose-induced obesity female	\downarrow Hepatic lipid stores;

			body weight / orally administrated for 10 weeks.	Sprague Dawley rats / 51-day-old	<-> Insulin; HOMA-IR index, plasma creatinine, triglyceride, body mass gain, linear growth (tibia and femur length) body mass index and waist circumference.
Ezzat et al., 2020	Leaves	Ethanol extract	200 and 400 mg/kg body weight / oral gavage for 1 month	HFD induced obesity male albino rats / Does not inform age	↓ weight and adiposity index; glucose, insulin, HOMA-IR and R-QUICKI; ↓ Leptin and vaspin; FAS and HMG-CoA reductase ↑ Adiponectin, omentin and GLUT-4, MC4R and PPAR-α expression.
Metwally et al., 2017	Aerial parts	Ethanol extract	600 mg/kg body weight / orally administered for 12 weeks	HCD-induce obesity female Wistar rats / 90 days of age	↓ Body weight, atherogenic index and cardiac risk index, glucose level, insulin, HOMA-IR, AST, ALT; <-> creatinine and urea nitrogen; ↓ Expression of leptin, resistin genes and ↑ adiponectin;
Oyeleye et al., 2019	Seeds and leaves	Does not report	HCD + 2% or 4% seed and HCD + 2% or 4% leaf // orally administered for 14 days	Adult male Wistar rats fed with HCD / Does not inform age	↓ ACE and Arginase activities; ↓ Cholesterol, LDL-C, Triglycerides; ↑ HDL-C; ↓ Atherogenic index

HCD, high-cholesterol diet; HFD, high fat diet; VHFD, very-high-fat diet; MIC-1, 4-[(α-L-rhamnosyloxy) benzyl] isothiocyanate; MSE, moringa seed extract; MC, Moringa concentrate; NQO1, quinone oxidoreductase; nitric oxide synthase (iNOS), IL-1β, interleukins-1β; IL-6, interleukins-6; TNF-α, tumor necrosis factor-α; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; ATGL, Adipose triglyceride lipase; HSL, hormone-sensitive lipase; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; AST, alanine aminotransferase; C/EBPs, CCAAT/enhancer-binding proteins; peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ); SREBP1, sterol regulatory element-binding protein; FAS, Fatty acid synthase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; OGTT, oral glucose tolerance test; GLUT4, glucose transporter type 4; ADRB3, beta-3 adrenergic receptor; Akt1 p, phosphAkt1(Ser473); Akt1, RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; Akt2, RAC-beta serine/threonine-protein kinase; IRS-1, insulin receptor substrate 1; PRDM16, PR domain containing 16; PGC-1α, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- alpha; UCP1, uncoupling protein 1; FSP27, cell death-inducing DFFA-like effector c; Gck, glucokinase; ACE, angiotensin-I converting enzyme.

4. Discussão

Na sociedade moderna, o aumento do consumo de alimentos ricos em gordura está diretamente associado à alta prevalência de obesidade, que se constitui em um problema de saúde pública e social de extrema importância na maioria dos países. O uso de compostos naturais é uma alternativa terapêutica para a prevenção e/ou tratamento de distúrbios metabólicos relacionados à obesidade. Em particular, o presente estudo resumiu as evidências mais precisas das ações de *M. oleifera* como agente para o tratamento da obesidade. Os dados coletados mostram que o uso de diferentes partes de *M. oleifera*, principalmente extratos de folhas e sementes, é uma estratégia promissora no tratamento de distúrbios metabólicos associados à obesidade, uma vez que apresentam importante ação antiadipogênica, anti-inflamatória, hipolipêmica e hipoglicêmica, melhoram a sensibilidade à insulina e modulam a microbiota intestinal.

Controlar o número e o tamanho dos adipócitos para promover a perda de peso é uma estratégia promissora e nesse sentido alguns estudos identificaram os mecanismos de ação de *M. oleifera* sobre a adipogênese. A diferenciação de adipócitos requer a ação sinérgica de múltiplos fatores de transcrição adipogênicos, como a família CCAAT / proteína de ligação de intensificador (C / EBP), C/EBP β e C/EBP δ são expressas na fase inicial de diferenciação e, subsequentemente, induzem a transcrição de peroxissoma-proliferador receptores gama (PPAR γ) e C/EBP α (Farmer, 2006). Extratos etanólicos e compostos bioativos de folhas (astragalina / isoquercetina / isotiocianato) e sementes (isotiocianato) de *M. oleifera* inibiram a adipogênese por reduzirem a expressão de PPAR γ , C/EBP α e C/EBP β (24,26,31). Além disso, regularam positivamente a expressão dos genes BAX e caspase-3, induzindo assim a apoptose de adipócitos maduros (24).

Outro mecanismo pelo qual as preparações de *Moringa oleifera* podem proteger contra a obesidade é através da regulação do metabolismo lipídico. Na verdade, a obesidade está sempre ligada a níveis elevados de lipídios e a modulação do metabolismo lipídico é um foco da síndrome metabólica (41). Extratos etanólicos das folhas de *M. oleifera* inibiram as enzimas α -glicosidase e lipase pancreática, limitando a absorção de glicose e lipídios necessários ao organismo (26). Portanto, essas preparações podem contribuir para a prevenção do excesso de peso. Além disso, preparações de *M. oleifera* reduziram os níveis plasmáticos de

triglicerídeos, colesterol total e LDL-C, bem como minimizaram o acúmulo de lipídeos nos adipócitos e no fígado em modelos murinos alimentados com HFD (21,22,32,35–37,39,40). Um perfil lipídico alterado associado a ratos alimentados com HFD causa dislipidemia junto com níveis elevados de ácidos graxos saturados (SFA) e glicose. Níveis aumentados de SFA podem afetar adversamente a sinalização da insulina, diminuir a captação muscular de glicose, amplificar a síntese de TG e induzir a gliconeogênese no fígado (42). Todos esses fatores podem contribuir para a hiperglicemia, considerada uma sequela comum da obesidade (43).

A obesidade também está associada à ativação crônica das vias inflamatórias em adipócitos e macrófagos que residem ou infiltram o tecido adiposo. Em resposta aos sinais inflamatórios, os adipócitos induzem a expressão e secreção de várias proteínas de fase aguda e mediadores da inflamação, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), interleucinas, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e potenciais moduladores inflamatórios, como leptina, adiponectina e resistina (44). O fator nuclear kappa-B (NF- κ B) tem papel central na regulação das vias inflamatórias em vários tipos de células (45,46). A ativação do NF- κ B resulta na indução de moléculas de adesão endotelial, como VCAM-1 e ICAM-1, que participam do recrutamento de leucócitos para lesões inflamatórias (47). Diferentes preparações de folhas e sementes de *M. oleifera* melhoraram a sensibilidade à insulina em um modelo experimental de obesidade, devido à redução das citocinas pró-inflamatórias e modulação dos níveis de adipocinas (21–23,32,37,39).

Além de induzir a perda de peso, controlar os níveis de lipídios e glicose plasmática, reduzir marcadores inflamatórios e melhorar a sensibilidade à insulina, *M. oleifera* parece modular a microbiota intestinal de camundongos obesos (23,36). O desenvolvimento de obesidade em resposta à HFD tem sido fortemente correlacionado com mudanças na composição da comunidade microbiana intestinal que foram correlacionadas com mudanças na função de barreira intestinal, aumento da resposta inflamatória e desenvolvimento de resistência à insulina (48). Nessa revisão, apenas dois estudos avaliaram os efeitos de preparações de *M. oleifera* sobre a microbiota intestinal. Mais estudos são necessários para mostrar a relação benéfica do uso de *M. oleifera* na microbiota intestinal em modelos de obesidade.

Esta revisão apresentou o potencial terapêutico de *M. oleifera* na redução da obesidade. No entanto, estudos clínicos em humanos são necessários para

comprovar os efeitos benéficos de *M. oleifera* nos distúrbios metabólicos associados à obesidade.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

Declaração de Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

Referências

1. Argolo DF, Hudis CA, Iyengar NM. The Impact of Obesity on Breast Cancer. *Curr Oncol Rep.* 11 de 2018;20(6):47.
2. Bhaskar S. Impact of obesity-induced type 2 diabetes on long-term outcomes following stroke. *Clin Sci.* 31 de julho de 2019;133(14):1603–7.
3. Landecho MF, Tuero C, Valentí V, Bilbao I, de la Higuera M, Frühbeck G. Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk. *Nutrients.* 5 de novembro de 2019;11(11).
4. Karczewski J, Begier-Krasińska B, Staszewski R, Popławska E, Gulczynska-Elhadi K, Dobrowolska A. Obesity and the Risk of Gastrointestinal Cancers. *Dig Dis Sci.* 2019;64(10):2740–9.
5. Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Hamid ZA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Acuin C, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet.* 16 de dezembro de 2017;390(10113):2627–42.
6. Albuquerque D, Nóbrega C, Manco L, Padez C. The contribution of genetics and environment to obesity. *Br Med Bull.* 1º de setembro de 2017;123(1):159–73.
7. Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, Walsh K. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 27 de maio de 2016;118(11):1786–807.
8. Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Compr Physiol.* 13 de dezembro de 2018;9(1):1–58.

9. Kang JG, Park C-Y. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes Metab J.* fevereiro de 2012;36(1):13–25.
10. Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology.* janeiro de 2009;49(1):80–6.
11. Halpern B, Halpern A. Safety assessment of FDA-approved (orlistat and lorcaserin) anti-obesity medications. *Expert Opin Drug Saf.* fevereiro de 2015;14(2):305–15.
12. Tziomalos K, Krassas GE, Tzotzas T. The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: an update. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5(1):441–52.
13. Thurairajah PH, Syn W-K, Neil DAH, Stell D, Haydon G. Orlistat (Xenical)-induced subacute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* dezembro de 2005;17(12):1437–8.
14. de Simone G, D’Addeo G. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* junho de 2008;18(5):337–41.
15. Solomon LR, Nixon AC, Ogden L, Nair B. Orlistat-induced oxalate nephropathy: an under-recognised cause of chronic kidney disease. *BMJ Case Rep.* 12 de novembro de 2017;2017.
16. Muhammad HI, Asmawi MZ, Khan NAK. A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. in tropical and sub-tropical regions. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 1º de outubro de 2016;6(10):896–902.
17. Adi AC, Rachmah Q, Arimbi AN. The Acceptance and Nutritional Value of Crispy Noodles Supplemented with *Moringa oleifera* as a Functional Snack for Children in a Food Insecure Area. *Prev Nutr Food Sci.* dezembro de 2019;24(4):387–92.
18. Omodanisi EI, Aboua YG, Chegou NN, Oguntibeju OO. Hepatoprotective, Antihyperlipidemic, and Anti-inflammatory Activity of *Moringa oleifera* in Diabetic-induced Damage in Male Wistar Rats. *Pharmacognosy Res.* junho de 2017;9(2):182–7.
19. Dhakad AK, Ikram M, Sharma S, Khan S, Pandey VV, Singh A. Biological, nutritional, and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam. *Phytother Res.* novembro de 2019;33(11):2870–903.
20. Saini RK, Sivanesan I, Keum Y-S. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech [Internet].* dezembro de 2016 [citado 7 de novembro de 2020];6(2). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033775/>

21. Metwally FM, Rashad HM, Ahmed HH, Mahmoud AA, Abdol Raouf ER, Abdalla AM. Molecular mechanisms of the anti-obesity potential effect of *Moringa oleifera* in the experimental model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. março de 2017;7(3):214–21.
22. Ezzat SM, El Bishbishy MH, Aborehab NM, Salama MM, Hasheesh A, Motaal AA, et al. Upregulation of MC4R and PPAR- α expression mediates the anti-obesity activity of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet-induced obesity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. abril de 2020;251:112541.
23. Jaja-Chimedza A, Zhang L, Wolff K, Graf BL, Kuhn P, Moskal K, et al. A dietary isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome. *Journal of Functional Foods*. agosto de 2018;47:376–85.
24. Balusamy SR, Perumalsamy H, Ranjan A, Park S, Ramani S. A dietary vegetable, *Moringa oleifera* leaves (drumstick tree) induced fat cell apoptosis by inhibiting adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Functional Foods*. agosto de 2019;59:251–60.
25. Muni Swamy G, Ramesh G, Devi Prasad R, Meriga B. Astragalin, (3-O-glucoside of kaempferol), isolated from *Moringa oleifera* leaves modulates leptin, adiponectin secretion and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 27 de março de 2020;1–7.
26. Kim D, Choi M, Shin H. Extracts of *Moringa oleifera* leaves from different cultivation regions show both antioxidant and antiobesity activities. *J Food Biochem* [Internet]. julho de 2020 [citado 3 de agosto de 2020];44(7). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfbc.13282>
27. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 21 de julho de 2009;6(7):e1000097.
28. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. 26 de março de 2014;14:43.
29. Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene--a review. *Diabetes Metab Syndr*. março de 2015;9(1):46–50.
30. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1º de abril de 2009;20(3):107–14.
31. Xie J, Wang Y, Jiang W-W, Luo X-F, Dai T-Y, Peng L, et al. *Moringa oleifera* Leaf Petroleum Ether Extract Inhibits Lipogenesis by Activating the AMPK Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 18 de dezembro de 2018;9:1447.
32. Waterman C, Rojas-Silva P, Tumer TB, Kuhn P, Richard AJ, Wicks S, et al. Isothiocyanate-rich *Moringa oleifera* extract reduces weight gain, insulin resistance, and hepatic gluconeogenesis in mice. *Mol Nutr Food Res*. junho de 2015;59(6):1013–24.

33. Huang L, Yuan C, Wang Y. Bioactivity-Guided Identification of Anti-Adipogenic Isothiocyanates in the Moringa (*Moringa oleifera*) Seed and Investigation of the Structure-Activity Relationship. *Molecules*. 28 de maio de 2020;25(11):2504.
34. Zhi J, Melia AT, Guerciolini R, Chung J, Kinberg J, Hauptman JB, et al. Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of orlistat in normal and obese volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. julho de 1994;56(1):82–5.
35. Ghasi S, Nwobodo E, Ofili JO. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. janeiro de 2000;69(1):21–5.
36. Elabd EMY, Morsy SM, Elmalt HA. Investigating of *Moringa Oleifera* Role on Gut Microbiota Composition and Inflammation Associated with Obesity Following High Fat Diet Feeding. *Open Access Maced J Med Sci*. 19 de agosto de 2018;6(8):1359–64.
37. Joung H, Kim B, Park H, Lee K, Kim H-H, Sim H-C, et al. Fermented *Moringa oleifera* Decreases Hepatic Adiposity and Ameliorates Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Journal of Medicinal Food*. maio de 2017;20(5):439–47.
38. Mabrouki L, Rjeibi I, Taleb J, Zourgui L. Cardiac Ameliorative Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract in High-Fat Diet-Induced Obesity in Rat Model. *BioMed Research International*. 28 de fevereiro de 2020;2020:1–10.
39. Muhammad N, Ibrahim KG, Ndhlala AR, Erlwanger KH. *Moringa oleifera* Lam. prevents the development of high fructose diet-induced fatty liver. *South African Journal of Botany*. março de 2020;129:32–9.
40. Oyeleye SI, Olasehinde TA, Ademosun AO, Akinyemi AJ, Oboh G. Horseradish (*Moringa oleifera*) seed and leaf inclusive diets modulates activities of enzymes linked with hypertension, and lipid metabolites in high-fat fed rats. *PharmaNutrition*. março de 2019;7:100141.
41. Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med*. dezembro de 2004;10(12):1344–51.
42. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta*. janeiro de 2007;375(1–2):20–35.
43. Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 7 de outubro de 2008;52(15):1201–10.
44. Su X, Peng D. Emerging functions of adipokines in linking the development of obesity and cardiovascular diseases. *Mol Biol Rep*. 1º de outubro de 2020;47(10):7991–8006.

45. Andreassen AS, Kelly M, Berg RMG, Møller K, Pedersen BK. Type 2 diabetes is associated with altered NF- κ B DNA binding activity, JNK phosphorylation, and AMPK phosphorylation in skeletal muscle after LPS. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e23999.
46. Blancas-Flores G, Alarcón-Aguilar FJ, García-Macedo R, Almanza-Pérez JC, Flores-Sáenz JL, Román-Ramos R, et al. Glycine suppresses TNF-alpha-induced activation of NF- κ B in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology*. 15 de agosto de 2012;689(1):270–7.
47. Kim I, Moon S-O, Kim S, Kim H, Koh Y, Koh G. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- B Activation in Endothelial Cells. *The Journal of biological chemistry*. 1º de abril de 2001;276:7614–20.
48. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 1º de julho de 2012;3(4):279–88.

5 CONCLUSÃO

- Preparações obtidas de semente de *M. oleifera* apresentaram ação antibacteriana *in vitro* frente a 3 espécies que podem estar associadas ao quadro de sepse;
- Em um modelo *in vivo* de sepse polimicrobiana a FR60 normalizou os níveis glicêmicos, reduziu citocinas inflamatórias e melhorou a sensibilidade à insulina, sugerindo seu potencial uso no controle glicêmico e na melhora do quadro de resistência à insulina induzido pela sepse;
- Ext-10%, FR60 e WSMoL reduziram significativamente os níveis séricos de TNF- α e INF- γ e modularam os níveis de metabólitos fecais em camundongos obesos;
- Ext-10% e FR60 reduziram consideravelmente o acúmulo de gordura hepática, a hipertrofia de adipócitos e infiltrado inflamatório em tecido adiposo de camundongos obesos;
- FR60 melhorou a tolerância à glicose em camundongos obesos alimentados com alto teor de gordura.
- O trabalho de revisão produzido revelou que folhas e sementes de *M. oleifera* tem potencial uso no tratamento e prevenção da obesidade.

REFERÊNCIAS

- A M HASSAN, F. et al. Production of Healthy Functional Soft White Cheese Using *Moringa oleifera* Oil. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 21, n. 8, p. 394–400, jan. 2018.
- ABARCA-GÓMEZ, L. et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. **The Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2627–2642, 16 dez. 2017.
- ABREU, T. M. et al. Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 534–541, maio 2018.
- ADEBAYO, I. A.; ARSAD, H.; SAMIAN, M. R. ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ON BREAST CANCER (MCF7) OF MORINGA OLEIFERA SEED EXTRACTS. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 14, n. 2, p. 282–287, 13 jan. 2017.
- ADI, A. C.; RACHMAH, Q.; ARIMBI, A. N. The Acceptance and Nutritional Value of Crispy Noodles Supplemented with *Moringa oleifera* as a Functional Snack for Children in a Food Insecure Area. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 4, p. 387–392, dez. 2019.
- AHL, S. et al. Adiponectin Levels Differentiate Metabolically Healthy vs Unhealthy Among Obese and Nonobese White Individuals. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 11, p. 4172–4180, nov. 2015.
- AHMAD, M. S. et al. Metabolic Phenotype of Obesity in a Saudi Population. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 2, p. 635–644, 3 fev. 2017.
- AIRES, V. et al. Healthy adiposity and extended lifespan in obese mice fed a diet supplemented with a polyphenol-rich plant extract. **Scientific Reports**, v. 9, 24 jun. 2019.
- AJIBOLA, M.; EUNICE, O.; STEPHANIE, I. N. **Effects of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Seeds on Alloxan Induced Hyperglycemia**. Disponível em: </paper/Effects-of-Aqueous-Extract-of-Moringa-ole-ifera-on-Ajibola-Eunice/1bd75d3cea863cf9ef757d5828447522b8387701>. Acesso em: 6 ago. 2019a.
- AJIBOLA, M.; EUNICE, O.; STEPHANIE, I. N. Effects of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Seeds on Alloxan Induced Hyperglycemia. **Basic Sciences of Medicine**, v. 3, n. 3, p. 37–42, 2014b.
- ALBENBERG, L. G.; WU, G. D. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1564–1572, maio 2014.

ALBUQUERQUE, D. et al. The contribution of genetics and environment to obesity. **British Medical Bulletin**, v. 123, n. 1, p. 159–173, 1 set. 2017.

ALEMAN, L.; GUERRERO, J. [Sepsis hyperglycemia in the ICU: from the mechanism to the clinic]. **Revista Medica De Chile**, v. 146, n. 4, p. 502–510, abr. 2018.

ALEMAN, M. et al. Presumed Neuroglycopenia Caused by Severe Hypoglycemia in Horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 5, p. 1731–1739, set. 2018.

ALLAM-NDOUL, B. et al. Associations between branched chain amino acid levels, obesity and cardiometabolic complications. **Integrative Obesity and Diabetes**, v. 1, n. 6, 2015.

AL-MALKI, A. L.; EL RABEY, H. A. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 381040, 2015.

ALMATRAFI, M. M. et al. Moringa Leaves Prevent Hepatic Lipid Accumulation and Inflammation in Guinea Pigs by Reducing the Expression of Genes Involved in Lipid Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1330, jul. 2017.

ALVES, R. R. et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730–736, fev. 2020.

AL-WAIZ, M. et al. The exogenous origin of trimethylamine in the mouse. **Metabolism**, v. 41, n. 2, p. 135–136, 1 fev. 1992.

AMAGLO, N. K. et al. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1047–1054, 15 out. 2010.

AN, Y. et al. High-Fat Diet Induces Dynamic Metabolic Alterations in Multiple Biological Matrices of Rats. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 8, p. 3755–3768, 2 ago. 2013.

ANDREASEN, A. S. et al. Type 2 diabetes is associated with altered NF- κ B DNA binding activity, JNK phosphorylation, and AMPK phosphorylation in skeletal muscle after LPS. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. e23999, 2011.

ARAÚJO, J. R. et al. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. **Biochimie, Microbe and Host Lipids Gerli Meeting**. v. 141, p. 97–106, 1 out. 2017.

ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013a.

ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013b.

ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013c.

ARGOLO, D. F.; HUDIS, C. A.; IYENGAR, N. M. The Impact of Obesity on Breast Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 20, n. 6, p. 47, 11 2018.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. A new antibiotic and the evolution of resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 12, p. 1168–1170, 19 mar. 2015.

AROCHA RODULFO, J. I. Sedentarism, a disease from xxi century. **Clinica E Investigacion En Arteriosclerosis: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Arteriosclerosis**, 17 jun. 2019.

BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2 nov. 2004.

BAKER, S. S. et al. Role of Alcohol Metabolism in Non-Alcoholic Steatohepatitis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 8 mar. 2010.

BALUSAMY, S. R. et al. A dietary vegetable, *Moringa oleifera* leaves (drumstick tree) induced fat cell apoptosis by inhibiting adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Functional Foods**, v. 59, p. 251–260, ago. 2019.

BARMA, P. et al. Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1792, n. 3, p. 190–200, mar. 2009.

BARRE, A. et al. Mannose-binding plant lectins: different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. **Biochimie**, v. 83, n. 7, p. 645–651, jul. 2001.

BHASKAR, S. Impact of obesity-induced type 2 diabetes on long-term outcomes following stroke. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 133, n. 14, p. 1603–1607, 31 jul. 2019.

BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 8–18, 1 jun. 2019a.

BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, v. 144, p. 8–18, 1 jun. 2019b.

BICHI, M. A Review of the applications of *Moringa oleifera* seeds extract in water treatment. **Civ. Environ. Res.**, v. 3, p. 1–11, 1 jan. 2013.

BLANCAS-FLORES, G. et al. Glycine suppresses TNF-alpha-induced activation of NF-kB in differentiated 3T3-L1 adipocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, n. 1, p. 270–277, 15 ago. 2012.

BLOOMGARDEN, Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? **Journal of Diabetes**, v. 10, n. 5, p. 350–352, maio 2018.

BOUTER, K. et al. Differential metabolic effects of oral butyrate treatment in lean versus metabolic syndrome subjects. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 9, n. 5, 25 maio 2018.

BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, nov. 2018.

BURHANS, M. S. et al. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. **Comprehensive Physiology**, v. 9, n. 1, p. 1–58, 13 dez. 2018.

CANFORA, E. E. et al. Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: a randomized crossover trial. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2360, 24 2017.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, jul. 2007.

CANI, P. D. et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 279–288, 1 jul. 2012.

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

CARVALHO, A. DE S. et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 402–408, abr. 2015.

CASTRO, G. et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. **FEBS open bio**, v. 3, p. 443–449, 2013.

CHAMBERS, E. S. et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. **Gut**, v. 64, n. 11, p. 1744–1754, 1 nov. 2015.

CHAMBERS, E. S. et al. Acute oral sodium propionate supplementation raises resting energy expenditure and lipid oxidation in fasted humans. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 1034–1039, 2018.

CHEN, M. et al. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. **mBio**, v. 7, n. 2, 5 abr. 2016.

CHIN, C.-Y. et al. Development and formulation of *Moringa oleifera* standardised leaf extract film dressing for wound healing application. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 188–199, 15 fev. 2018.

CHINETTI-GBAGUIDI, G.; STAELS, B. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. **Current Opinion in Lipidology**, v. 22, n. 5, p. 365–372, out. 2011.

CHOLAK, I. S. et al. A study of lectin activity in buds of *Sophora japonica* L. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1877–1881, 5 out. 2016.

CHOUSTERMAN, B. G. et al. Ly6Chigh Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 27, n. 3, p. 792–803, mar. 2016.

CHOUSTERMAN, B. G.; SWIRSKI, F. K.; WEBER, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 517–528, jul. 2017.

CHU, D.-T. et al. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. **Physiological Reports**, v. 5, n. 7, abr. 2017.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, 11 jan. 2005.

COCHET, F.; PERI, F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 3 nov. 2017.

COELHO, J. S. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 934–938, 1 nov. 2009.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2017, p. 1594074, 2017.

COPAESCU, A. et al. The role of IL-6 and other mediators in the cytokine storm associated with SARS-CoV-2 infection. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 3, p. 518- 534.e1, set. 2020.

CORIOLOANO, M. C. et al. Immunomodulatory Effects of the Water-soluble Lectin from *Moringa oleifera* Seeds (WSMoL) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Protein and Peptide Letters**, v. 25, n. 3, p. 295–301, 2018.

CORIOLOANO, M. C. et al. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, Special Issue on *Moringa* Research. v. 129, p. 198–205, 1 mar. 2020.

COSTA, R. B. et al. Purification and characterization of a lectin with refolding ability from *Genipa americana* bark. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 517–523, nov. 2018.

COSTA, V. S.; MATTANA, T. C. C.; DA SILVA, M. E. R. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 88, n. 3, p. 222–226, jun. 2010.

CRAM, J. A. et al. Human gut microbiota is associated with HIV-reactive immunoglobulin at baseline and following HIV vaccination. **PloS One**, v. 14, n. 12, p. e0225622, 2019.

DA SILVA, P. M. et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, mar. 2018.

DA SILVA, P. M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 600–608, 15 fev. 2019.

DALBY, M. J. et al. Diet induced obesity is independent of metabolic endotoxemia and TLR4 signalling, but markedly increases hypothalamic expression of the acute phase protein, SerpinA3N. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15648, 23 out. 2018.

DANIEL, V. et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IFN- γ ⁺ human induced T regulatory cells are induced by interferon- γ and suppress alloresponses nonspecifically. **Human Immunology**, v. 72, n. 9, p. 699–707, 1 set. 2011.

DE ALVARO, C. et al. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17070–17078, 23 abr. 2004.

DE LA CUESTA-ZULUAGA, J. et al. Higher Fecal Short-Chain Fatty Acid Levels Are Associated with Gut Microbiome Dysbiosis, Obesity, Hypertension and Cardiometabolic Disease Risk Factors. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 27 dez. 2018.

DE MEDEIROS, M. L. S. et al. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782–789, mar. 2018.

DE OLIVEIRA, C. F. R. et al. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 67–76, out. 2017.

DE OLIVEIRA, K. A. et al. Phytomodulatory proteins promote inhibition of hepatic glucose production and favor glycemic control via the AMPK pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2342–2347, 1 jan. 2019.

- DE SIMONE, G.; D'ADDEO, G. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 18, n. 5, p. 337–341, jun. 2008.
- DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. Suppl 2, p. S157–S163, nov. 2009.
- DEN BESTEN, G. et al. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2398–2408, jul. 2015.
- DEUTSCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. Sepsis: current dogma and new perspectives. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 463–475, 17 abr. 2014.
- DHAKAD, A. K. et al. Biological, nutritional, and therapeutic significance of *Moringa oleifera* Lam. **Phytotherapy research: PTR**, v. 33, n. 11, p. 2870–2903, nov. 2019.
- DING, L. et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis is associated with bile acid metabolism. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 286, 19 dez. 2018.
- DIXON, B. The role of microvascular thrombosis in sepsis. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 32, n. 5, p. 619–629, out. 2004.
- EJTAHED, H.-S. et al. Targeting obesity management through gut microbiota modulation by herbal products: A systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 42, p. 184–204, fev. 2019.
- EJTAHED, H.-S. et al. Gut microbiota-derived metabolites in obesity: a systematic review. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 39, n. 3, p. 65–76, 2020.
- ELABD, E. M. Y.; MORSY, S. M.; ELMALT, H. A. Investigating of *Moringa Oleifera* Role on Gut Microbiota Composition and Inflammation Associated with Obesity Following High Fat Diet Feeding. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 8, p. 1359–1364, 19 ago. 2018.
- EL-ARABY, M. M. et al. Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three Egyptian leguminous seeds. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 90, 15 maio 2020.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 462–467, dez. 1997.
- ESPER, A. M. et al. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 10, p. 2576–2582, out. 2006.
- EZZAT, S. M. et al. Upregulation of MC4R and PPAR- α expression mediates the anti-obesity activity of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 251, p. 112541, abr. 2020.

FARDET, A. Characterization of the Degree of Food Processing in Relation With Its Health Potential and Effects. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 85, p. 79–129, 2018.

FASANO, A. Gut permeability, obesity, and metabolic disorders: who is the chicken and who is the egg? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 3–4, 1 jan. 2017.

FERNÁNDEZ-VELEDO, S. et al. c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation by tumor necrosis factor-alpha induces insulin resistance in human visceral but not subcutaneous adipocytes: reversal by liver X receptor agonists. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3583–3593, set. 2009.

FERREIRA, F. B. D. et al. Glucose homeostasis in two degrees of sepsis lethality induced by caecum ligation and puncture in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 6, p. 329, dez. 2017.

FERREIRA, P. M. P. et al. Moringa oleifera: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431–437, ago. 2008.

FERREIRA, R. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from Moringa oleifera. **Letters in applied microbiology**, v. 53, p. 186–92, 23 maio 2011a.

FERREIRA, R. S. et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from Moringa oleifera. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 186–192, ago. 2011b.

FREITAS, J. H. E. S. et al. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble Moringa oleifera seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v. 163, p. 133–141, nov. 2016.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. RESISTÊNCIA À INSULINA ASSOCIADO À OBESIDADE: EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO EXERCÍCIO FÍSICO - DOI: <http://dx.doi.org/10.18511/0103-1716/rbcm.v22n3p139-147>. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 139–147, 6 set. 2014.

FRIEDMAN, S. L. et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, v. 24, n. 7, p. 908–922, 2018.

FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and septic shock: a history. **Critical Care Clinics**, v. 25, n. 1, p. 83–101, viii, jan. 2009.

FURUKAWA, M. et al. Sepsis patients with complication of hypoglycemia and hypoalbuminemia are an early and easy identification of high mortality risk. **Internal and Emergency Medicine**, v. 14, n. 4, p. 539–548, jun. 2019.

FUSTER, J. J. et al. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1786–1807, 27 maio 2016.

GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 21–25, jan. 2000.

GIL-CARDOSO, K. et al. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. **The British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 2, p. 218–229, 2017.

GOMES, M. DE B. et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 no Brasil: estudo multicêntrico nacional. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 1, p. 136–144, fev. 2006.

GOUEL-CHÉRON, A. et al. Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33095, 2012.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. [10] Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press, 1955. v. 1p. 67–90.

GRZELKOWSKA-KOWALCZYK, K.; WIETESKA-SKRZECZYŃSKA, W. Treatment with IFN-gamma prevents insulin-dependent PKB, p70S6k phosphorylation and protein synthesis in mouse C2C12 myogenic cells. **Cell Biology International**, v. 34, n. 1, p. 117–124, 16 dez. 2009.

GUALBERTO, A. F.; FERRARI, G. M. Características, propriedades e potencialidades da moringa (*Moringa oleifera* Lam.): Aspectos agroecológicos. v. 9, n. 5, p. 7, 2014.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **The Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T1–T23, fev. 2014.

GUPTA, R. et al. The Efficacy of Intensive versus Conventional Insulin Therapy in Reducing Mortality and Morbidity in Medical and Surgical Critically Ill Patients: A Randomized Controlled Study. **Anesthesia, Essays and Researches**, v. 14, n. 2, p. 295–299, jun. 2020.

HALPERN, B.; HALPERN, A. Safety assessment of FDA-approved (orlistat and lorcaserin) anti-obesity medications. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 2, p. 305–315, fev. 2015.

HARRISON, S. A. et al. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 49, n. 1, p. 80–86, jan. 2009.

HAUFE, S. et al. Branched-chain and aromatic amino acids, insulin resistance and liver specific ectopic fat storage in overweight to obese subjects. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 26, n. 7, p. 637–642, 2016.

- HEIANZA, Y. et al. Gut microbiota metabolites, amino acid metabolites and improvements in insulin sensitivity and glucose metabolism: the POUNDS Lost trial. **Gut**, v. 68, n. 2, p. 263–270, 2019.
- HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333–336, 21 nov. 2002.
- HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC medical research methodology**, v. 14, p. 43, 26 mar. 2014.
- HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862–874, dez. 2013.
- HSIEH, C. S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5107, p. 547–549, 23 abr. 1993.
- HUANG, L.; YUAN, C.; WANG, Y. Bioactivity-Guided Identification of Anti-Adipogenic Isothiocyanates in the Moringa (*Moringa oleifera*) Seed and Investigation of the Structure-Activity Relationship. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2504, 28 maio 2020.
- HUANG, M.; CAI, S.; SU, J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, 29 out. 2019.
- HUANG, S. et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 2002–2013, set. 2012.
- HWANG, D. H.; KIM, J.-A.; LEE, J. Y. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 24–35, 15 ago. 2016.
- IJAROTIMI, O. S.; ADEOTI, O. A.; ARIYO, O. Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 6, p. 452–463, 1 nov. 2013.
- INGELS, C.; VANHOREBEEK, I.; VAN DEN BERGHE, G. Glucose homeostasis, nutrition and infections during critical illness. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 10–15, jan. 2018.
- Isolation, Purification and Characterization of a Lectin from a Local Kashmiri Variety of Soybean (*Glycine max*) - SciAlert Responsive Version.** Disponível em: <<https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=ajb.2010.145.153>>. Acesso em: 17 ago. 2018.
- JAACKS, L. M. et al. The Obesity Transition: Stages of the global epidemic. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, v. 7, n. 3, p. 231–240, 1 mar. 2019.

JAFAR, N.; EDRISS, H.; NUGENT, K. The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 351, n. 2, p. 201–211, fev. 2016.

JAJA-CHIMEDZA, A. et al. A dietary isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome. **Journal of Functional Foods**, v. 47, p. 376–385, ago. 2018.

JANANI, C.; RANJITHA KUMARI, B. D. PPAR gamma gene--a review. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 9, n. 1, p. 46–50, mar. 2015.

JIANG, S.; MESSINA, J. L. Role of inhibitory κ B kinase and c-Jun NH2-terminal kinase in the development of hepatic insulin resistance in critical illness diabetes. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 3, p. G454–G463, set. 2011.

JOUNG, H. et al. Fermented *Moringa oleifera* Decreases Hepatic Adiposity and Ameliorates Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 5, p. 439–447, maio 2017.

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 26–34, fev. 2012.

KANG, J. G.; PARK, C.-Y. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 36, n. 1, p. 13–25, fev. 2012.

KANG, S. et al. Implications of IL-6 Targeting Therapy for Sepsis. **Immunotherapy: Open Access**, v. 03, 1 jan. 2017.

KARCZEWSKI, J. et al. Obesity and the Risk of Gastrointestinal Cancers. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 64, n. 10, p. 2740–2749, 2019.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219–230, 1 jan. 1995a.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219–230, 1 jan. 1995b.

KHAN, I. M. et al. Intermuscular and perimuscular fat expansion in obesity correlates with skeletal muscle T cell and macrophage infiltration and insulin resistance. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 39, n. 11, p. 1607–1618, nov. 2015.

KIECOLT-GLASER, J. K. et al. Marital distress, depression, and a leaky gut: Translocation of bacterial endotoxin as a pathway to inflammation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 98, p. 52–60, dez. 2018.

KIM, D.; CHOI, M.; SHIN, H. Extracts of *Moringa oleifera* leaves from different cultivation regions show both antioxidant and antiobesity activities. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 7, jul. 2020.

KIM, I. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- κ B Activation in Endothelial Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, p. 7614–20, 1 abr. 2001.

KIM, K. N.; YAO, Y.; JU, S. Y. Short Chain Fatty Acids and Fecal Microbiota Abundance in Humans with Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 18 out. 2019.

KIM, S. J. et al. Dietary fat intake and age modulate the composition of the gut microbiota and colonic inflammation in C57BL/6J mice. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 193, 20 ago. 2019.

KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, 5 jan. 2016.

KLAG, T. et al. Interleukin-6 Kinetics can be Useful for Early Treatment Monitoring of Severe Bacterial Sepsis and Septic Shock. **Infectious Disease Reports**, v. 8, n. 1, p. 6213, 21 mar. 2016.

KONG, W. et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1344–1351, dez. 2004.

KORKMAZ, M. F. et al. Reliability of Pro-adrenomedullin and Interleukin 1 β in Predicting Severity of Community-Acquired Pneumonia in Pediatric Patients. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 48, n. 1, p. 81–89, jan. 2018.

KUMAR, K. K. et al. Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 1 jan. 2012.

LANDECHO, M. F. et al. Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 5 nov. 2019.

LÊ, K.-A. et al. Subcutaneous Adipose Tissue Macrophage Infiltration Is Associated With Hepatic and Visceral Fat Deposition, Hyperinsulinemia, and Stimulation of NF- κ B Stress Pathway. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2802–2809, nov. 2011.

LEE, J. Y. et al. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16683–16689, 18 maio 2001.

LEFTEROVA, M. I.; LAZAR, M. A. New developments in adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 107–114, 1 abr. 2009.

LENDAK, D. F. et al. The role of TNF- α superfamily members in immunopathogenesis of sepsis. **Cytokine**, v. 111, p. 125–130, 1 nov. 2018.

LEONE, A. et al. Moringa oleifera Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2141, dez. 2016.

LEVY, M. M.; EVANS, L. E.; RHODES, A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. **Intensive Care Medicine**, v. 44, n. 6, p. 925–928, 2018.

LI, H.; YU, X. Emerging role of JNK in insulin resistance. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 5, p. 422–428, set. 2013.

LI, W. L. et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 1–21, maio 2004.

LIN, H. et al. Correlations of Fecal Metabonomic and Microbiomic Changes Induced by High-fat Diet in the Pre-Obesity State. **Scientific Reports**, v. 6, 26 fev. 2016.

LIN, H. V. et al. Diabetes in mice with selective impairment of insulin action in Glut4-expressing tissues. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 700–709, mar. 2011.

LIONAKIS, M. S. et al. CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes Candida control and host survival. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 12, p. 5035–5051, dez. 2013.

LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, n. 1, p. 1–12, 1 jan. 2010.

LIU, K. et al. [Progress of therapeutic strategies for glucose metabolic disorders in sepsis]. **Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue**, v. 30, n. 6, p. 616–618, jun. 2018.

LIU, R. et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. **Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 859–868, jul. 2017.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951a.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951b.

LU, Y.-C.; YEH, W.-C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, 1 maio 2008.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, jan. 2007.

LV, S. et al. Suppression of CRTIC2-mediated hepatic gluconeogenesis by TRAF6 contributes to hypoglycemia in septic shock. **Cell Discovery**, v. 2, p. 16046, 13 dez. 2016.

MABROUKI, L. et al. Cardiac Ameliorative Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract in High-Fat Diet-Induced Obesity in Rat Model. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–10, 28 fev. 2020.

- MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, nov. 2017.
- MAGNE, F. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? **Nutrients**, v. 12, n. 5, 19 maio 2020.
- MAKKI, K. et al. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 6, p. 705–715, 13 jun. 2018.
- MARIAT, D. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 123, 9 jun. 2009.
- MARIK, P. E.; BELLOMO, R. Stress hyperglycemia: an essential survival response! **Critical Care (London, England)**, v. 17, n. 2, p. 305, 6 mar. 2013.
- MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546–1554, 17 abr. 2003.
- MARTIN, G. S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 6, p. 701–706, jun. 2012.
- MARTIN, S. S.; QASIM, A.; REILLY, M. P. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 15, p. 1201–1210, 7 out. 2008.
- MARTÍNEZ-CARMONA, M. et al. Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 65, p. 393–404, 1 jan. 2018.
- MASHARANI, U. B. et al. Insulin resistance in non-obese subjects is associated with activation of the JNK pathway and impaired insulin signaling in skeletal muscle. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e19878, 11 maio 2011.
- MAZALOVSKA, M.; KOUOKAM, J. C. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **BioMed Research International**, v. 2020, 15 maio 2020.
- MEDEIROS, M. L. S. et al. In vitro effects of Moringa oleifera seed lectins on Haemonchus contortus in larval and adult stages. **Experimental Parasitology**, v. 218, p. 108004, nov. 2020.
- MEIRELES, D. et al. A review of properties, nutritional and pharmaceutical applications of Moringa oleifera: integrative approach on conventional and traditional Asian medicine. **Advances in Traditional Medicine**, p. 1–21, 17 ago. 2020.
- METWALLY, F. M. et al. Molecular mechanisms of the anti-obesity potential effect of Moringa oleifera in the experimental model. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 3, p. 214–221, mar. 2017.

MINAIYAN, M. et al. Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 4, n. 2, p. 127–136, mar. 2014.

MISHRA, A. et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110827, dez. 2019.

MLINAR, B. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 375, n. 1–2, p. 20–35, jan. 2007.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, 21 jul. 2009.

MOLLICA, M. P. et al. Butyrate Regulates Liver Mitochondrial Function, Efficiency, and Dynamics in Insulin-Resistant Obese Mice. **Diabetes**, v. 66, n. 5, p. 1405–1418, 2017.

MOPURI, R.; ISLAM, M. S. Medicinal plants and phytochemicals with anti-obesogenic potentials: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 89, p. 1442–1452, maio 2017.

MORENO-NAVARRETE, J. M. et al. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e37160, 2012.

MOROWITZ, M. J.; CARLISLE, E.; ALVERDY, J. C. Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. **The Surgical clinics of North America**, v. 91, n. 4, p. 771–785, ago. 2011.

MOURA, M. C. et al. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666–676, set. 2015.

MOURA, M. C. et al. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 861–874, out. 2017.

MUHAMMAD, H. I.; ASMAWI, M. Z.; KHAN, N. A. K. A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. in tropical and sub-tropical regions. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 10, p. 896–902, 1 out. 2016.

MUHAMMAD, N. et al. *Moringa oleifera* Lam. prevents the development of high fructose diet-induced fatty liver. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 32–39, mar. 2020.

MUNI SWAMY, G. et al. Astragalgin, (3-O-glucoside of kaempferol), isolated from *Moringa oleifera* leaves modulates leptin, adiponectin secretion and inhibits

adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–7, 27 mar. 2020.

NAIR, S. et al. Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 4, p. 1200–1204, abr. 2001.

NANDIPATI, K. C.; SUBRAMANIAN, S.; AGRAWAL, D. K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 426, n. 1–2, p. 27–45, fev. 2017.

NAPOLEÃO, T. H. et al. Affinity matrices of *Cratylia mollis* seed lectins for isolation of glycoproteins from complex protein mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 3, p. 744–755, out. 2013.

NETTO CANDIDO, T. L.; BRESSAN, J.; ALFENAS, R. DE C. G. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. **Nutricion Hospitalaria**, v. 35, n. 6, p. 1432–1440, 3 dez. 2018.

NGUYEN, M. T. A. et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 48, p. 35279–35292, 30 nov. 2007.

NI, H.-M. et al. Caspase Inhibition Prevents Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis and Promotes Necrotic Cell Death in Mouse Hepatocytes in Vivo and in Vitro. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 10, p. 2623–2636, out. 2016.

OH, D. Y. et al. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 346–354, fev. 2012.

OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; OLOKOBA, L. B. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. **Oman Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 269–273, jul. 2012.

OLSON, M. E.; FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. **Revista mexicana de biodiversidad**, v. 82, n. 4, p. 1071–1082, dez. 2011.

OMODANISI, E. I. et al. Hepatoprotective, Antihyperlipidemic, and Anti-inflammatory Activity of *Moringa oleifera* in Diabetic-induced Damage in Male Wistar Rats. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 2, p. 182–187, jun. 2017.

OMODANISI, E. I.; ABOUA, Y. G.; OGUNTIBEJU, O. O. Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Moringa Oleifera* in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 4, 23 mar. 2017.

OYELEYE, S. I. et al. Horseradish (*Moringa oleifera*) seed and leaf inclusive diets modulates activities of enzymes linked with hypertension, and lipid metabolites in high-fat fed rats. **PharmaNutrition**, v. 7, p. 100141, mar. 2019.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113–118, 1992a.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 113–118, 1 ago. 1992b.

PARNELL, J. A. et al. The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance. **Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 32, n. 5, p. 701–711, maio 2012.

PAULA, P. C. et al. Insulin-like plant proteins as potential innovative drugs to treat diabetes-The *Moringa oleifera* case study. **New Biotechnology**, v. 39, n. Pt A, p. 99–109, 25 out. 2017.

PEREIRA, F. et al. Production of Methyl Biodiesel Using Purified Oil of *Moringa oleifera* Lamarck (in portuguese); Produção de biodiesel metílico com óleo purificado de *Moringa oleifera* Lamarck. **Revista Virtual de Química**, v. 8, 1 jan. 2016.

PERNER, A. et al. Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 12, p. 1958–1969, dez. 2016.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 165–169, jul. 2000.

POOL, R.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. **Critical care clinics**, v. 34, n. 1, p. 63–80, jan. 2018.

PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419–429, maio 2017.

RANDRIAMBOAVONJY, J. I. et al. *Moringa oleifera* Seeds Improve Aging-Related Endothelial Dysfunction in Wistar Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 13 maio 2019.

RAO, R. K.; SETH, A.; SHETH, P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, n. 6, p. G881-884, jun. 2004.

REBOLLO-HERNANZ, M. et al. Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 110672, 1 out. 2019.

REYNOLDS, J. M.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 413–423, dez. 2010.

RILLAHAN, C. D.; PAULSON, J. C. Glycan microarrays for decoding the glycome. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 797–823, 2011.

ROCHA, D. M. et al. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. **Atherosclerosis**, v. 244, p. 211–215, jan. 2016.

ROCHWERG, B. et al. Corticosteroids in Sepsis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1411–1420, set. 2018.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795–804, ago. 2007.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, 30 mar. 2018.

ROLIM, L. A. D. M. M. et al. Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. T53-58, mar. 2011.

ROMERO, C. R. et al. The role of interferon- γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 4, p. 725–735, out. 2010.

ROWLAND, A. F.; FAZAKERLEY, D. J.; JAMES, D. E. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 12, n. 6, p. 672–681, jun. 2011.

SAA, R. W. et al. Treatments and uses of *Moringa oleifera* seeds in human nutrition: A review. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 6, p. 1911–1919, jun. 2019.

SABIO, G.; DAVIS, R. J. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 9, p. 490–496, set. 2010.

SADEK, K. M. et al. The chemo-prophylactic efficacy of an ethanol *Moringa oleifera* leaf extract against hepatocellular carcinoma in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1458–1466, dez. 2017.

SAHURI-ARISOYLU, M. et al. Reprogramming of hepatic fat accumulation and “browning” of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 40, n. 6, p. 955–963, 2016.

SAINI, R. K.; SIVANESAN, I.; KEUM, Y.-S. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, dez. 2016.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 1–4, 03 2017.

SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; BELTRÁN-HEREDIA, J.; PERES, J. A. Improvement of the flocculation process in water treatment by using moringa oleifera seeds extract. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 3, p. 495–502, set. 2012.

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from Moringa oleifera seeds. **Water Research**, v. 39, n. 6, p. 975–980, mar. 2005.

SANTOS, L. M. M. et al. Anti-Candida activity of the water-soluble lectin from Moringa oleifera seeds (WSMoL). **Journal De Mycologie Medicale**, p. 101074, 2 nov. 2020.

SANTOS, N. D. DE L. et al. Evaluation of Moringa oleifera seed lectin in traps for the capture of Aedes aegypti eggs and adults under semi-field conditions. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1837–1842, maio 2014.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. In: **Advances in Immunology**. [s.l.] Academic Press, 2007. v. 96p. 41–101.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 18, n. 1, p. 190–195, jan. 2010.

SELEME, M. C. et al. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Recruitment of Inflammatory Mononuclear Cells Leads to Inflammation and Altered Brain Development in Murine Cytomegalovirus-Infected Newborn Mice. **Journal of Virology**, v. 91, n. 8, 29 mar. 2017.

SELYE, H. What is stress? **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 5, n. 5, p. 525–530, set. 1956.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 337–340, 28 jan. 2016.

SERINO, M. et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. **Gut**, v. 61, n. 4, p. 543–553, 1 abr. 2012.

SHALITIN, S.; MORENO, L. A. Obesity, Metabolic Syndrome and Nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 117, p. 15–38, 2018.

SHI, T. et al. IL-10 secreting B cells regulate periodontal immune response during periodontitis. **Odontology**, v. 108, n. 3, p. 350–357, jul. 2020.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 23 fev. 2016.

SNODGRASS, R. G. et al. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 191, n. 8, p. 4337–4347, 15 out. 2013.

SOLINAS, G. et al. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 386–397, nov. 2007.

SOLINAS, G.; BECATTINI, B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 174–184, 2017a.

SOLINAS, G.; BECATTINI, B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 174–184, 1 fev. 2017b.

SOLOMON, L. R. et al. Orlistat-induced oxalate nephropathy: an under-recognised cause of chronic kidney disease. **BMJ case reports**, v. 2017, 12 nov. 2017.

SOUZA, J. D. et al. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696–702, 1 ago. 2011.

SSEKITOLEKO, R. et al. Hypoglycemia at admission is associated with inhospital mortality in Ugandan patients with severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 10, p. 2271–2276, out. 2011.

STAGAKIS, I. et al. Anti-tumor necrosis factor therapy improves insulin resistance, beta cell function and insulin signaling in active rheumatoid arthritis patients with high insulin resistance. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 3, p. R141, 12 jun. 2012.

STANLEY, T. L. et al. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 1, p. E146-150, jan. 2011.

STORTZ, J. A. et al. Old Mice Demonstrate Organ Dysfunction as well as Prolonged Inflammation, Immunosuppression, and Weight Loss in a Modified Surgical Sepsis Model. **Critical Care Medicine**, v. 47, n. 11, p. e919–e929, nov. 2019.

SU, X.; PENG, D. Emerging functions of adipokines in linking the development of obesity and cardiovascular diseases. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 10, p. 7991–8006, 1 out. 2020.

SUK, K. T.; KIM, D. J. Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 3, p. 193–204, mar. 2019.

SUN, C. et al. In vitro/in vivo hepatoprotective properties of 1-O-(4-hydroxymethylphenyl)- α -L-rhamnopyranoside from *Moringa oleifera* seeds against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 131, p. 110531, set. 2019.

SURMI, B. K.; HASTY, A. H. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. **Future Lipidology**, v. 3, n. 5, p. 545–556, 2008.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 335–376, 2003.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 19 mar. 2010.

TAN, X. et al. Trimethylamine N-Oxide Aggravates Liver Steatosis through Modulation of Bile Acid Metabolism and Inhibition of Farnesoid X Receptor Signaling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 17, p. e1900257, set. 2019.

TANAKA, H. et al. Lipopolysaccharide inhibits hepatic gluconeogenesis in rats: The role of immune cells. **Journal of Diabetes Investigation**, 14 ago. 2017.

TANG, L.-L. et al. Effect of high-fat or high-glucose diet on obesity and visceral adipose tissue in mice. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 36, n. 6, p. 614–619, dez. 2014.

THURAIRAJAH, P. H. et al. Orlistat (Xenical)-induced subacute liver failure. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 12, p. 1437–1438, dez. 2005.

TONG, X. et al. Structural Alteration of Gut Microbiota during the Amelioration of Human Type 2 Diabetes with Hyperlipidemia by Metformin and a Traditional Chinese Herbal Formula: a Multicenter, Randomized, Open Label Clinical Trial. **mBio**, v. 9, n. 3, 22 2018.

TRACEY, K. J. et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 662–664, 17 dez. 1987.

TSAI, S. et al. Are obesity-related insulin resistance and type 2 diabetes autoimmune diseases? **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 1886–1897, jun. 2015.

TSUKUMO, D. M. L. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986–1998, 2007.

TZIOMALOS, K.; KRASSAS, G. E.; TZOTZAS, T. The use of sibutramine in the management of obesity and related disorders: an update. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, n. 1, p. 441–452, 2009.

VAN GREEVENBROEK, M. M. J.; SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 71, n. 4, p. 174–187, maio 2013.

VANDERLEI, E. S. O. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 9, p. 1113–1118, set. 2010.

VENDEMIATO, A. V. R. et al. Microbiological characteristics of sepsis in a University hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, 14 fev. 2015.

VENET, F.; RIMMELÉ, T.; MONNERET, G. Management of Sepsis-Induced Immunosuppression. **Critical Care Clinics**, v. 34, n. 1, p. 97–106, jan. 2018.

VERGARA-JIMENEZ, M.; ALMATRAFI, M. M.; FERNANDEZ, M. L. Bioactive Components in Moringa Oleifera Leaves Protect against Chronic Disease. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 91, dez. 2017.

VIANA, M. V. et al. [Assessment and treatment of hyperglycemia in critically ill patients]. **Revista Brasileira De Terapia Intensiva**, v. 26, n. 1, p. 71–76, mar. 2014.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 6, p. 707–714, dez. 1999.

VLASSELAERS, D. et al. Intensive insulin therapy for patients in paediatric intensive care: a prospective, randomised controlled study. **The Lancet**, v. 373, n. 9663, p. 547–556, 14 fev. 2009.

VOLACO, A. et al. Socioeconomic Status: The Missing Link Between Obesity and Diabetes Mellitus? **Current Diabetes Reviews**, v. 14, n. 4, p. 321–326, 2018.

WANG, K. et al. Obesity: An emerging driver of head and neck cancer. **Life Sciences**, p. 116687, 23 jul. 2019.

WATERMAN, C. et al. Isothiocyanate-rich *Moringa oleifera* extract reduces weight gain, insulin resistance, and hepatic gluconeogenesis in mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 6, p. 1013–1024, jun. 2015.

WEIS, S. et al. Metabolic Adaptation Establishes Disease Tolerance to Sepsis. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1263–1275.e14, 15 jun. 2017.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, dez. 2003.

WEN, Y.; CROWLEY, S. D. Renal Effects of Cytokines in Hypertension. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1165, p. 443–454, 2019.

WENSVEEN, F. M. et al. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 9, p. 2446–2456, set. 2015.

WINDEY, K.; PRETER, V. D.; VERBEKE, K. Relevance of protein fermentation to gut health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 1, p. 184–196, 2012.

WU, A. M.; LIU, J. H. Lectins and ELLSA as powerful tools for glycoconjugate recognition analyses. **Glycoconjugate Journal**, v. 36, n. 2, p. 175–183, abr. 2019.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 43–54, 03 2017.

- XIE, J. et al. Moringa oleifera Leaf Petroleum Ether Extract Inhibits Lipogenesis by Activating the AMPK Signaling Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1447, 18 dez. 2018.
- XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, dez. 2003.
- XU, J. et al. Synergistic steatohepatitis by moderate obesity and alcohol in mice despite increased adiponectin and p-AMPK. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 673–682, 1 set. 2011.
- YURRE, A. R. DE et al. Evaluation of the Cardiac Effects of a Water-Soluble Lectin (Wsmol) from Moringa Oleifera Seeds. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**, v. 114, n. 6, p. 1029–1037, jun. 2020.
- ZAMAN, S. B. et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**, v. 9, n. 6, [s.d.].
- ZENG, Q. et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13424, 17 set. 2019.
- ZHANG, F. et al. Neutrophil Dysfunction in Sepsis. **Chinese Medical Journal**, v. 129, n. 22, p. 2741–2744, 20 nov. 2016.
- ZHANG, K. et al. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on the Expression of Programmed Cell Death Factor 5 in Arthritis. **Orthopaedic Surgery**, v. 11, n. 4, p. 698–704, 8 jul. 2019.
- ZHANG, X. et al. Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. **Diabetes**, v. 60, n. 2, p. 486–495, fev. 2011.
- ZHANG, X.-Y. et al. Anaphylatoxin C5a induces inflammation and reduces insulin sensitivity by activating TLR4/NF-kB/PI3K signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 103, p. 955–964, jul. 2018.
- ZHI, J. et al. Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of orlistat in normal and obese volunteers. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 56, n. 1, p. 82–85, jul. 1994.
- ZHU, L. et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 57, n. 2, p. 601–609, fev. 2013.
- ZHU, L. et al. Gut microbiota produce alcohol and contribute to NAFLD. **Gut**, v. 65, n. 7, p. 1232, 2016.

ZHUANG, Y.-T. et al. IL-6 induced lncRNA MALAT1 enhances TNF- α expression in LPS-induced septic cardiomyocytes via activation of SAA3. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 302–309, jan. 2017.

ZONG, X. et al. Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. **Animal Nutrition**, v. 6, n. 4, p. 389–396, 1 dez. 2020.

APÊNDICE A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351

fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 23 de fevereiro de 2018.

Ofício nº 03/118

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Patricia Maria Guedes Paiva**

Departamento de Bioquímica

Centro da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0042/2017**

Certificamos que a proposta intitulada “**avaliação do efeito do extrato aquoso de semente de moringa oleifera e da lectina wsmol na via inflamatória e na sinalização da insulina em modelo de sepse e obesidade.**”, registrada com o nº **0042/2017**, sob a responsabilidade de Prof.ª **Patricia Maria Guedes Paiva** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 05/12/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/2017 até 03/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heretogenico
Nº de animais	144
Peso/Idade	25-35g/ 30 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição – CCS/UFPE

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA

Evaluation of the cardiac effects of a water-soluble lectin (WSMoL) from *Moringa oleifera* seeds

doi: <https://doi.org/10.36660/abc.20190071>



ABC Cardiol

Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Fator de Impacto: 1.450 (JCR 2019)



Evaluation of the Cardiac Effects of a Water-Soluble Lectin (Wsmol) from *Moringa Oleifera* Seeds

Ainhoa Rodríguez de Yurre,^{1*} José Dayvid Ferreira da Silva,^{2*} Marília Kalinne da Silva Torres,^{2*} Eduarda Lopes Martins,^{1*} Isalira Peroba Ramos,¹ Wênio Sandoval Filho Lima da Silva,² Jéssica da Silva Sarpa,² Caio César da Silva Guedes,² Thiago Henrique Napoleão,^{2*} Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho,² Patrícia Maria Guedes Paiva,² Emiliano Medei^{1*}

Universidade Federal do Rio de Janeiro,¹ Rio de Janeiro, RJ–Brazil

Universidade Federal de Pernambuco,² Recife, PE–Brazil

* These authors contributed equally to this work

Abstract

Background: *Moringa oleifera* seeds, which are used for water clarification, contain a lectin named WSMoL which has shown *in vitro* antibacterial and immunomodulatory activity. Due to their nutritional value and therapeutic potential, the leaves and seeds of this tree are eaten in some communities. Some plant lectins are non-toxic to mammals, but others have been reported to be harmful when ingested or administered by other means.

Objective: As one of the steps needed to define the safety of WSMoL, we evaluated possible cardiotoxic effects of this purified protein.

Methods: WSMoL was administered for 21 consecutive days to mice by gavage. Electrophysiological, mechanical, and metabolic cardiac functions were investigated by *in vivo* and *ex vivo* electrocardiographic recordings, nuclear magnetic resonance, and high-resolution respirometry.

Results: The treatment with WSMoL did not induce changes in blood glucose levels or body weight in comparison with control group. Moreover, the heart weight/body weight and heart weight/tibia length ratios were similar in both groups. Lectin ingestion also did not modify glucose tolerance or insulin resistance. No alterations were observed in electrocardiographic parameters or cardiac action potential duration. The heart of mice from the control and WSMoL groups showed preserved left ventricular function. Furthermore, WSMoL did not induce changes in mitochondrial function (in all cases, $p > 0.05$).

Conclusions: The administration of WSMoL demonstrated a cardiac safety profile. These results contribute to the safety evaluation of using *M. oleifera* seeds to treat water, since this lectin is present in the preparation employed by some populations to this end. (Arq Bras Cardiol. 2020; 114(6):1029-1037)

Keywords: *Moringa Oleifera* (WSMoL), Lectins, Glycosides, Carbohydrates; Heart; Water Security; Mice.

Introduction

Moringa oleifera Lamarck (Moringaceae) is a tree that is native to the south Himalaya region, widely cultivated on Asia and throughout the tropics mainly due to its use for water clarification. It has been employed in traditional medicine, as well as in food, cosmetic, and pharmaceutical industries,^{1,2} and it is also used to treat different diseases, such as cancer and chronic and infectious diseases.^{3,4}

A water-soluble lectin isolated from the seeds of *M. oleifera* (WSMoL) has shown insecticidal activity,^{5,7} and *in vitro* studies demonstrated its antibacterial activity against corrosive and pathogenic bacteria.⁸⁻¹⁰ WSMoL demonstrated *in vitro* anti-inflammatory activity on lipopolysaccharide-stimulated murine

macrophages,¹¹ and it was able to activate human lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell cultures, showing an immunomodulatory effect.¹² It has also been proven that WSMoL is one of the coagulant proteins found in *M. oleifera* seeds^{8,13} and it is able to reduce the turbidity and ecotoxicity of water samples collected from a polluted stream.¹⁴

It is well demonstrated that many antibiotics and some classes of anti-inflammatory drugs are usually associated with cardiotoxic effects.^{15,16} The injurious events of these drugs in the cardiovascular system include the occurrence of heart failure with systolic ventricular dysfunction, arrhythmias, and myocardial ischemia.¹⁷ Classically, as a consequence of cardiotoxicity, changes on the electrocardiogram (ECG) can be observed, such as QT interval prolongation, which has been observed in patients who have used several classes of antimicrobials, including macrolides and fluoroquinolones.¹⁸⁻²⁰ Among macrolides, intravenous administration of erythromycin presents the greatest risk. It increases the QT interval, and fatal arrhythmias have been reported when it was used alone or in combination with other QT-prolonging drugs.¹⁶ Thus, protection of cardiac function is currently a constant challenge for the pharmaceutical industry, regulatory authorities, and physicians facing adverse clinical reactions to various therapeutic agents in clinical practice.

Mailing Address: Emiliano Medei •

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco G, Postal Code 21941-901, Rio de Janeiro, RJ – Brazil

E-mail: emedei70@biof.ufrj.br

Manuscript received February 20, 2018, revised manuscript May 04, 2019, accepted June 23, 2019

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20190071>

WSMoL has emerged as a potential antibacterial drug and as an immunomodulatory agent. Some plant lectins are non-toxic to mammals,^{21,22} but others have been reported to be harmful when ingested or administered by other means, such as intraperitoneal injection.²³ Thus, as one of the steps needed to define the safety of WSMoL, this study evaluated this protein's possible cardiotoxic effects.

Methods

Plant material and lectin isolation

Moringa oleifera seeds were collected in Recife (Pernambuco, Brazil) with the authorization (no. 38690) of the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio, acronym in Portuguese) and stored at -20°C . A sample of the collected material was stored as a voucher specimen (number 73345) at the Dárdano de Andrade Lima herbarium of the Agronomy Institute of Pernambuco. The access was recorded (A6CAB4C) in the National System For The Management Of Genetic Heritage And Associated Traditional Knowledge (SisGen, acronym in Portuguese).

WSMoL was isolated from seed powder according to the protocol previously described by Coelho et al.⁵ Briefly, proteins were extracted in distilled water, and, after filtration and centrifugation, the extract was treated with ammonium sulfate at 60% saturation²⁴ for 4 h at 28°C . After another centrifugation, the precipitate was resuspended in water and dialyzed for 8 h against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h). The dialyzed fraction (100 mg of proteins) was loaded onto a chitin column equilibrated with 0.15 M NaCl (20 mL/h flow rate) and WSMoL was eluted with 1.0 M acetic acid. The isolated lectin was dialyzed against distilled water with three liquid changes for eluent elimination. Carbohydrate-binding activity of the lectin was monitored during the purification process by the hemagglutinating activity assay according to the method described by Paiva and Coelho.²⁵

Animals

Adult male C57BL/6 mice were used and maintained at the Carlos Chagas Filho Biophysics Institute (IBCCF, acronym in Portuguese) of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ, acronym in Portuguese) under controlled conditions of constant temperature (23°C), in a standard light/dark cycle of 12h/12h with free access to food and water. All experiments were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and the the applied protocols received approval from the Committee on Ethics in Animal Research of UFRJ, under protocol number DFBCICB041. The mice were used for experiments for 21 days.

Experimental conditions

The animals were separated into two experimental groups: CNTRL (control group) and WSMoL (animals treated with WSMoL). Several studies by our group have extensively performed experiments with WSMoL using concentrations ranging from $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ to $0.2\ \text{mg}/\text{ml}$ ⁵⁻¹² in order to test several biological effects of WSMoL. In the present study, in order

to test its cardiotoxicity of this purified protein, a 10 times higher concentration of WSMoL was used. Thus, the animals of the WSMoL group were treated with the lectin (purified protein) via gavage, at a concentration of $5\ \text{mg}/\text{kg}$ body weight (equivalent to $2\ \text{mg}/\text{ml}$) for 21 days. The animals in the CNTRL group were treated with milli-Q water via gavage for 21 days.

Cardiac hypertrophy

In order to evaluate the existence of possible cardiac hypertrophy, the mice's hearts were weighed, and data were normalized by calculating the heart weight/body weight (HW/BW) and heart weight/tibia length (HW/TL) ratios.^{26,27} After weighing, the animals were euthanized by cervical dislocation. Subsequently, the hearts were extracted, washed with phosphate buffered saline (PBS), dried to remove liquid excess, and weighed. The length of the tibia was measured with a caliper.

Fasting glucose, intraperitoneal glucose tolerance test, and intraperitoneal insulin tolerance test

Fasting blood glucose (FBG) concentrations were determined from tail vein blood using an automated glucometer (Contour™ TS Bayer). For intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT), mice were fasted for 6 h and 4 h, respectively. After the fasting period, animals received intraperitoneally $2\ \text{g}/\text{kg}$ of glucose for IPGTT or $0.5\ \text{IU}/\text{kg}$ of insulin for IPITT,²⁸ and FBG levels were monitored 0, 15, 30, 60, 120 min after injection from a tail snip. The area under the curve (AUC) was calculated using all the time points, discounting baseline glucose values from each animal.

Electrocardiography and echocardiography

In order to assess the cardiac electrical activity *in vivo*, an electrocardiogram (ECG) recording was carried out in conscious animals using a noninvasive method,²⁹ namely, two subcutaneous electrodes were implanted under isoflurane anesthesia in the right and left forepaws, corresponding to ECG lead I. At the time of registration, the electrodes were connected by flexible cables to a homemade DC-coupled differential amplifier (kindly provided by Dr. Ariel Escobar, University of California, Merced, USA) using a 500 Hz low-pass filter and an acquisition frequency of 1 kHz. The signal was digitized using Digidata 1440A (Axon Instruments, San José, CA, USA) and recorded using a Labview-based acquisition program (National Instruments, Austin, TX, USA). The durations of the following intervals were analyzed: PR, RR, QRS, and QJ.

Cardiac function was evaluated by *in vivo* echocardiography (ECHO) using the Vevo 770 High-Resolution Imaging System (VisualSonics, Toronto, Canada) coupled to a 30 MHz transducer, under isoflurane anesthesia. Images were acquired in bidimensional mode and analyzed by a blinded investigator. Left ventricular end-diastolic volume, end-systolic volume, ejection fraction, and fractional area change were calculated using Simpson's method. In brief, these parameters of cardiac function were evaluated in a long parasternal axis view and four high-temporal resolution B-mode short-axis images, taken at different ventricular levels, as described previously.³⁰

Action potential

In order to perform intact cardiac action potential (AP) records, a Langendorff retrograde perfusion system was used to maintain the hearts functional *ex vivo* for hours, as previously described.^{31,32} To avoid tissue damage by the formation of blood clots, animals were injected intraperitoneally with Na⁺-heparin 15 min before euthanization by cervical dislocation. Hearts were rapidly removed, cannulated by the aorta, and perfused continuously with an oxygenated Tyrode solution containing the following, (in mM): NaCl 140, KCl 5.3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaPO₄H₂ 0.33, HEPES 10, and glucose 10. The pH was calibrated to 7.4 with NaOH at 32 °C. To decrease mechanical contraction, the hearts were perfused with Tyrode containing 4 mM of Blebbistatin (Selleckchem, Houston, TX, USA).

To record electrical signals, borosilicate glass (10-40 MΩ) microelectrodes were used. These microelectrodes were filled with 3 M KCl solution and inserted into a holder (MEH1SF12, World Precision Instrument [WPI], Sarasota, FL, USA) embedded in a micromanipulator (MM33 links, WPI) connected to the input of a pre-amplifier (Electro 705, WPI). The microelectrodes were placed on the surface of the left ventricle and the reading of the microelectrode was set to zero. Amplified signals were digitalized (NI USB 6281, National Instrument) and analyzed with a homemade program in LabView (kindly developed and provided by Dr. Ariel Escobar, University of California, Merced, CA, USA).

The parameters analyzed were action potential duration (APD) at 30% and 90% repolarization (APD₃₀ and APD₉₀, respectively).

Isolation of mice heart mitochondria

Isolation of mitochondria from the hearts was adapted from the protocol described by Affourtit et al.³³ with minor modifications. The hearts were rapidly dissected and rinsed in ice-cold Chappell-Perry (CP) buffer containing the following (in mM): KCl 100, Tris-HCl 50, EGTA 2 at pH 7.2. The hearts were weighed, minced with razor blades and washed 4 to 5 times with CP buffer. The tissue was subsequently incubated for 5 min with CP buffer supplemented with 0.5% albumin, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, and 125 U/100 mL protease type VIII, at a proportion of 1 mL/100 mg of tissue. The hearts were then homogenized (Ultra-turrax homogenizer [IKA®], Campinas, SP, Brazil), low setting, 3 s, 3 times) and the resultant homogenate was centrifuged. The supernatant was centrifuged and the pellet was washed and resuspended into ice-cold CP buffer and finally centrifuged. The final mitochondrial pellet was resuspended into a small volume of CP buffer. The protein dosage of the obtained preparation was performed by the method described by Lowry et al.³⁴. The isolated mitochondrial preparations were subjected to high resolution respirometry to measure the fluxes of oxygen consumption.

High resolution respirometry

For the analyses of the oxygen consumption, isolated mitochondria were used. The experiments were performed on a high-resolution O₂k-respirometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria, EU) at 37°C with mitochondrial respiration media (MIR05) containing the following (in mM): EGTA 0.5,

MgCl₂ 3, K-MES 60, taurine 20, KH₂PO₄ 20, HEPES 20, sucrose 110 and 1 g/L fat free BSA at pH 7.1. The protocol used to evaluate mitochondrial function was adapted from Pesta and Gnaiger,³⁵ consisting of sequential addition of multiple substrates and inhibitors, namely, the following: 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate, 10 mM glutamate, 100 μM adenosine 5'-diphosphate (ADP), 1 mM ADP, 10 mM succinate, 0.2 μg/mL oligomycin, and 2 μM antimycin A. Respiratory control ratio (RCR) was calculated by the oxygen flux after addition of succinate in the presence of ADP, divided by the flux after oligomycin. The maximal phosphorylative capacity of electron transport system (OXPHOS) was calculated by the oxygen consumption following addition of succinate minus residual oxygen consumption (ROX), which was estimated after the addition of antimycin A. The non-specific leak of protons was determined by oxygen flux insensitive to oligomycin minus ROX. Another distinct protocol was performed by changing the sequence of the substrates in order to calculate the electron leakage, the ratio of hydrogen peroxide (H₂O₂) production by O₂ flux. The order of titration of this protocol was the following: 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate, 10 mM glutamate, 10 mM succinate, 1 mM ADP, and 0.2 μg/mL oligomycin. Data were analyzed in DatLab 5 software (Oroboros Instruments) and expressed in pmol O₂/mg/s.

Mitochondrial H₂O₂ production

Mitochondrial H₂O₂ was measured by monitoring the resorufin appearance rate at 563/587 nm (excitation/emission) in a fluorescence spectrophotometer (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The same concentration of isolated mitochondria used in the oxygen consumption experiments was added in 2 mL of MIR05 supplemented with 5.5 μM Amplex red, 2 U/mL peroxidase, and 40 U/mL superoxide dismutase. The assays of H₂O₂ production were performed at 37 °C, and the substrates, inhibitors, and uncouplers were added every 2 min in the following order: 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate, 10 mM glutamate, 10 mM succinate, 1 mM ADP, 0.2 μg/mL oligomycin, 2 titres of 0.5 μM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), and 2 μM antimycin A. The data generated in arbitrary units of fluorescence were analyzed in Origin Pro-8 software (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) and normalized to pmol of H₂O₂/mg/min from standard calibration curves of H₂O₂ performed in the presence of the same number of isolated mitochondria for each experiment.

Statistical analysis

Values are expressed as mean ± SD or median (with interquartile range). In order to compare the results between CNTRL and WSMoL, unpaired Student's t test was used, when appropriate. On the other hand, data showing non-Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test) were compared by the Mann-Whitney test. Differences between variables were considered significant when p value was < 0.05. All analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). We did not use statistical methods to predetermine sample size. Samples sizes were estimated on the basis of sample availability and previous experimental studies of the cardiovascular system.^{29,30}

Action potential

In order to perform intact cardiac action potential (AP) records, a Langendorff retrograde perfusion system was used to maintain the hearts functional *ex vivo* for hours, as previously described.^{31,32} To avoid tissue damage by the formation of blood clots, animals were injected intraperitoneally with Na⁺-heparin 15 min before euthanization by cervical dislocation. Hearts were rapidly removed, cannulated by the aorta, and perfused continuously with an oxygenated Tyrode solution containing the following, (in mM): NaCl 140, KCl 5.3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaPO₄H₂ 0.33, HEPES 10, and glucose 10. The pH was calibrated to 7.4 with NaOH at 32 °C. To decrease mechanical contraction, the hearts were perfused with Tyrode containing 4 mM of Blebbistatin (Selleckchem, Houston, TX, USA).

To record electrical signals, borosilicate glass (10-40 MΩ) microelectrodes were used. These microelectrodes were filled with 3 M KCl solution and inserted into a holder (MEH1SF12, World Precision Instrument [WPI], Sarasota, FL, USA) embedded in a micromanipulator (MM33 links, WPI) connected to the input of a pre-amplifier (Electro 705, WPI). The microelectrodes were placed on the surface of the left ventricle and the reading of the microelectrode was set to zero. Amplified signals were digitalized (NI USB 6281, National Instrument) and analyzed with a homemade program in LabView (kindly developed and provided by Dr. Ariel Escobar, University of California, Merced, CA, USA).

The parameters analyzed were action potential duration (APD) at 30% and 90% repolarization (APD₃₀ and APD₉₀, respectively).

Isolation of mice heart mitochondria

Isolation of mitochondria from the hearts was adapted from the protocol described by Affourtit et al.³³ with minor modifications. The hearts were rapidly dissected and rinsed in ice-cold Chappell-Perry (CP) buffer containing the following (in mM): KCl 100, Tris-HCl 50, EGTA 2 at pH 7.2). The hearts were weighed, minced with razor blades and washed 4 to 5 times with CP buffer. The tissue was subsequently incubated for 5 min with CP buffer supplemented with 0.5% albumin, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, and 125 U/100 mL protease type VIII, at a proportion of 1 mL/100 mg of tissue. The hearts were then homogenized (Ultra-turrax homogenizer [IKA®], Campinas, SP, Brazil), low setting, 3 s, 3 times) and the resultant homogenate was centrifuged. The supernatant was centrifuged and the pellet was washed and resuspended into ice-cold CP buffer and finally centrifuged. The final mitochondrial pellet was resuspended into a small volume of CP buffer. The protein dosage of the obtained preparation was performed by the method described by Lowry et al.³⁴. The isolated mitochondrial preparations were subjected to high resolution respirometry to measure the fluxes of oxygen consumption.

High resolution respirometry

For the analyses of the oxygen consumption, isolated mitochondria were used. The experiments were performed on a high-resolution O₂k-respirometer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria, EU) at 37°C with mitochondrial respiration media (MIR05) containing the following (in mM): EGTA 0.5,

MgCl₂ 3, K-MES 60, taurine 20, KH₂PO₄ 20, HEPES 20, sucrose 110 and 1 g/L fat free BSA at pH 7.1. The protocol used to evaluate mitochondrial function was adapted from Pesta and Gnaiger,³⁵ consisting of sequential addition of multiple substrates and inhibitors, namely, the following: 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate, 10 mM glutamate, 100 μM adenosine 5'-diphosphate (ADP), 1 mM ADP, 10 mM succinate, 0.2 μg/mL oligomycin, and 2 μM antimycin A. Respiratory control ratio (RCR) was calculated by the oxygen flux after addition of succinate in the presence of ADP, divided by the flux after oligomycin. The maximal phosphorylative capacity of electron transport system (OXPHOS) was calculated by the oxygen consumption following addition of succinate minus residual oxygen consumption (ROX), which was estimated after the addition of antimycin A. The non-specific leak of protons was determined by oxygen flux insensitive to oligomycin minus ROX. Another distinct protocol was performed by changing the sequence of the substrates in order to calculate the electron leakage, the ratio of hydrogen peroxide (H₂O₂) production by O₂ flux. The order of titration of this protocol was the following: 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate, 10 mM glutamate, 10 mM succinate, 1 mM ADP, and 0.2 μg/mL oligomycin. Data were analyzed in DatLab 5 software (Oroboros Instruments) and expressed in pmol O₂/mg/s.

Mitochondrial H₂O₂ production

Mitochondrial H₂O₂ was measured by monitoring the resorufin appearance rate at 563/587 nm (excitation/emission) in a fluorescence spectrophotometer (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The same concentration of isolated mitochondria used in the oxygen consumption experiments was added in 2 mL of MIR05 supplemented with 5.5 μM Amplex red, 2 U/mL peroxidase, and 40 U/mL superoxide dismutase. The assays of H₂O₂ production were performed at 37 °C, and the substrates, inhibitors, and uncouplers were added every 2 min in the following order: 5 mM pyruvate, 2.5 mM malate, 10 mM glutamate, 10 mM succinate, 1 mM ADP, 0.2 μg/mL oligomycin, 2 titres of 0.5 μM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), and 2 μM antimycin A. The data generated in arbitrary units of fluorescence were analyzed in Origin Pro-8 software (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) and normalized to pmol of H₂O₂/mg/min from standard calibration curves of H₂O₂ performed in the presence of the same number of isolated mitochondria for each experiment.

Statistical analysis

Values are expressed as mean ± SD or median (with interquartile range). In order to compare the results between CNTRL and WSMoL, unpaired Student's t test was used, when appropriate. On the other hand, data showing non-Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test) were compared by the Mann-Whitney test. Differences between variables were considered significant when p value was < 0.05. All analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). We did not use statistical methods to predetermine sample size. Samples sizes were estimated on the basis of sample availability and previous experimental studies of the cardiovascular system.^{29,30}

Results

The 21-day treatment with WSMoL did not induce changes ($p > 0.05$) in blood glucose levels (Figure 1A) or body weight (Figure 1B) in comparison with CNTRL group. In addition, the HW/BW (Figure 1C) and HW/TL (Figure 1D) ratios were similar ($p > 0.05$) in both groups, indicating that no cardiac hypertrophy was developed. The treatment also did not modify glucose tolerance (Figure 1E) or insulin resistance (Figure 1F) in comparison with untreated mice ($p > 0.05$), revealing absence of alterations in carbohydrate metabolism.

Figure 2 shows the ECG parameters at day 21 of treatment. The PR, RR, QRS, and QJ intervals (Figure 2C–F) were not significantly different ($p > 0.05$) between the WSMoL and CNTRL groups. The APD_{30} and APD_{50} were similar ($p > 0.05$) between untreated and treated mice (Figure 2G–J). Thus, the data obtained here consistently demonstrated that WSMoL treatment was safe for the electrical behavior of mouse heart.

Since some antibiotics have been shown to be able to impair left ventricular function and structure, we studied the left ventricular function in detail by ECHO (Figure 3). The mice from both CNTRL and WSMoL groups showed preserved left ventricular structure and function, as indicated by the absence of significant differences ($p > 0.05$) in the following parameters: ejection fraction (Figure 3A), fractional area change (Figure 3B), stroke volume (Figure 3C), end-diastolic volume (Figure 3D), end-systolic volume (Figure 3E), and left ventricular mass (Figure 3F). Taken together, these data show that WSMoL treatment did not impair left ventricular function.

Finally, in order to verify whether WSMoL interferes in the physiology of heart mitochondrial function, we performed experimental approaches to analyze two important mitochondrial functions: oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production. The 21-day treatment with WSMoL did not induce alterations in the mitochondrial oxygen consumption, as can be observed in Figure 4A–E. In addition, the treatment did not interfere in the rate of H_2O_2 production in the presence of different substrates, inhibitors, and uncouplers (Figure 4F), nor did it alter electron leakage (Figure 4G) when compared to the CNTRL group.

Discussion

The high toxicity of some drugs currently used for treatment of several diseases is a major concern in health systems. For example, several classes of antibiotics are cardiotoxic.^{18–20} In this scenario, natural compounds have been increasingly studied due to their potential for drug discovery and development.³⁶ However, it is also important to evaluate the safety of natural compounds used for food and medical purposes. Previous studies by our group demonstrated the antibacterial and immunomodulatory activities of WSMoL,^{8–10} which is also a coagulant protein from *M. oleifera* seeds. In this study, we evaluated possible cardiotoxic effects of orally administrated WSMoL on mice. Safety studies are imperative, even when lectins are administered orally, since it has been reported that some proteins of this class can cross the intestinal barrier and be found systemically.³⁷

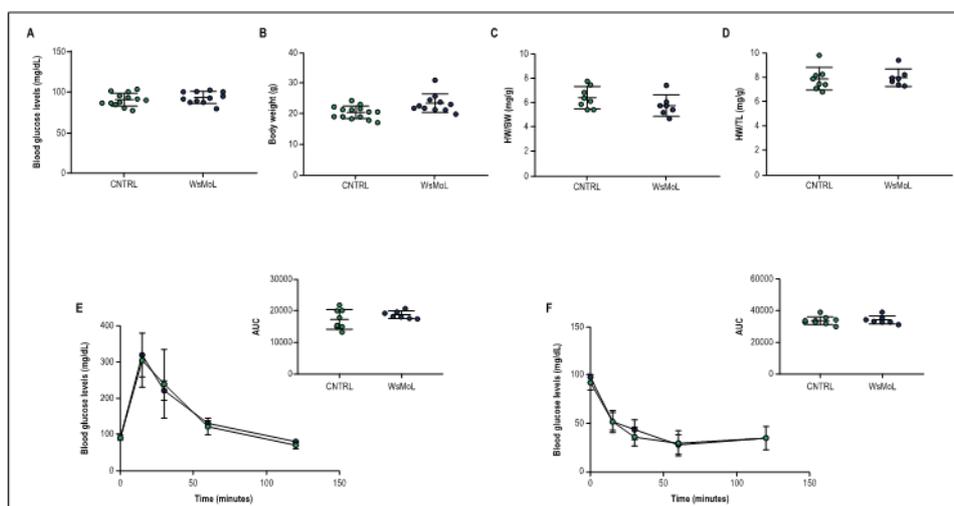


Figure 1 – WSMoL treatment for 21 days did not induce metabolic alterations. (A) Blood glucose levels after 21 days of treatment with saline (CNTRL) or WSMoL (WSMoL) solution (CNTRL $n = 14$ mice and WSMoL $n = 11$ mice), (B) body weight of CNTRL and WSMoL groups (CNTRL $n = 14$ mice and WSMoL $n = 11$ mice), (C) heart weight/body weight ratio (CNTRL $n = 8$ mice and WSMoL $n = 7$ mice) and (D) heart weight/tibia length ratio, showing that the treatment with 5mg/kg body weight of WSMoL preserves cardiac structure (CNTRL $n = 8$ mice and WSMoL $n = 7$ mice), (E) intraperitoneal glucose tolerance test and (F) intraperitoneal insulin tolerance test with their correspondent AUC graphs on inset (CNTRL $n = 9$ mice and WSMoL $n = 7$ mice). Each dot represents individual values and lines represent mean values. ○: CNTRL mice; ●: WSMoL mice. Comparisons between groups were performed using unpaired Student's t test. The results are shown as mean \pm SD.

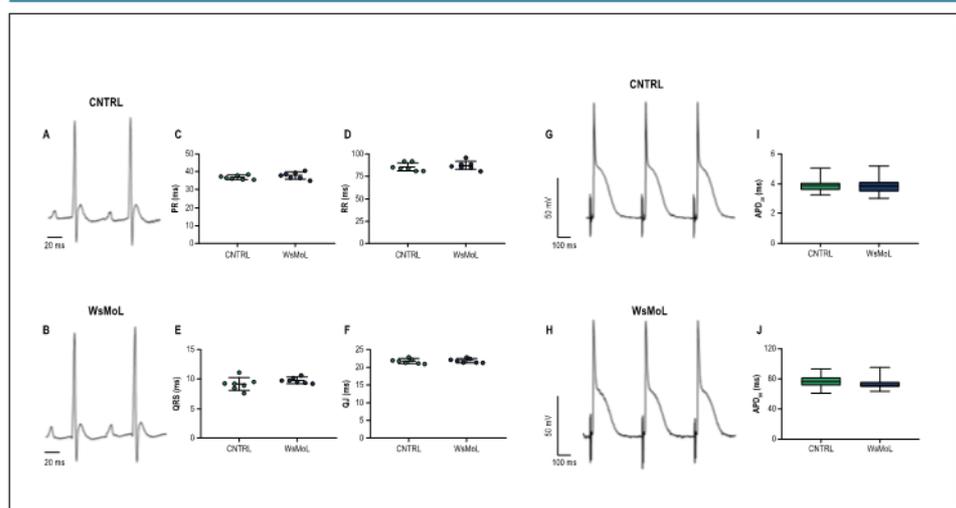


Figure 2 – WSMoL did not impair *in vivo* or *in vitro* cardiac electrical activity. Representative *in vivo* ECG recordings of (A) CNTRL and (B) WSMoL groups. (C) PR, (D) RR, (E) QRS and (F) QJ intervals summarized the data obtained after 21 days of WSMoL treatment (CNTRL $n = 7$ mice; 2,034 measurements and WSMoL $n = 7$ mice; 2,038 measurements). Each dot represents individual values and lines represent mean values. Representative *in vitro* recordings of ventricular action potential of (G) CNTRL and (H) WSMoL groups are showed. The effect of WSMoL treatment on action potential duration at (I) 30% and (J) 90% repolarization are summarized (CNTRL $n = 5$ hearts; 483 measurements, and WSMoL $n = 4$ hearts; 545 measurements). Each dot represents individual measurements and lines represent mean values. Comparisons between groups were performed using unpaired Student's *t* test, and data that did not show Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test) were compared by the Mann Whitney test. ○: CNTRL mice; ●: WSMoL mice. The results are shown as mean \pm SD for data with Gaussian distribution and as median and interquartile range for data with non-Gaussian distribution.

There is a belief that the natural origin of a product guarantees its safety to humans. However, some natural compounds may exert toxic effects, including on the cardiac level. For example, the alkaloid aconitine, an ingredient of Fuzi (a traditional Chinese medicine), was pointed out as the cause of bidirectional ventricular tachycardia.³⁸

It is also well known that several antibiotics are able to block hERG potassium channels, prolonging the QT interval and the APD.³⁹⁻⁴¹ Guo et al.⁴² observed a prolongation of APD using erythromycin in neonatal mouse ventricular myocytes. Zhang M. et al.⁴³ also showed that azithromycin, when administered in guinea pigs, caused significant prolongations of APD₅₀ and APD₉₀.

Accordingly, we evaluated the effects of WSMoL treatment on the cardiac electric activity both *in vivo* and *ex vivo*, in mice, observing that it was cardiologically safe.

Another effect observed in some antibiotics is the impairment of left ventricular function and structure, as observed by Zhang M. et al.⁴³. Furthermore, some studies have shown that antibiotics and other natural compounds can impair mitochondrial function.^{44,45} However, after 21 days of WSMoL treatment, we observed that left ventricular function and mitochondrial function were preserved.

Conclusion

The data presented here indicate that the administration of WSMoL by gavage did not have cardiotoxic effects on mice treated for 21 days. These results contribute to the safety evaluation of the use of *M. oleifera* seeds to treat water, since this lectin is present in the preparation employed by some populations to this end.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and investigator research grants (THN, PMGP, EHM). We are also grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Financial Code: 001) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0661-2.08/15) for financial support. JDFS would like to thank FACEPE (IBPG-0841-2.08/15) for graduate scholarship and CAPES for mobility assistance (88881.068531/2014-01; PROCAD/2013 - 88887.124150/2014-00). In addition, the authors want to thanks Professor Ariel Escobar from University of California who gave us support to record and analyze the

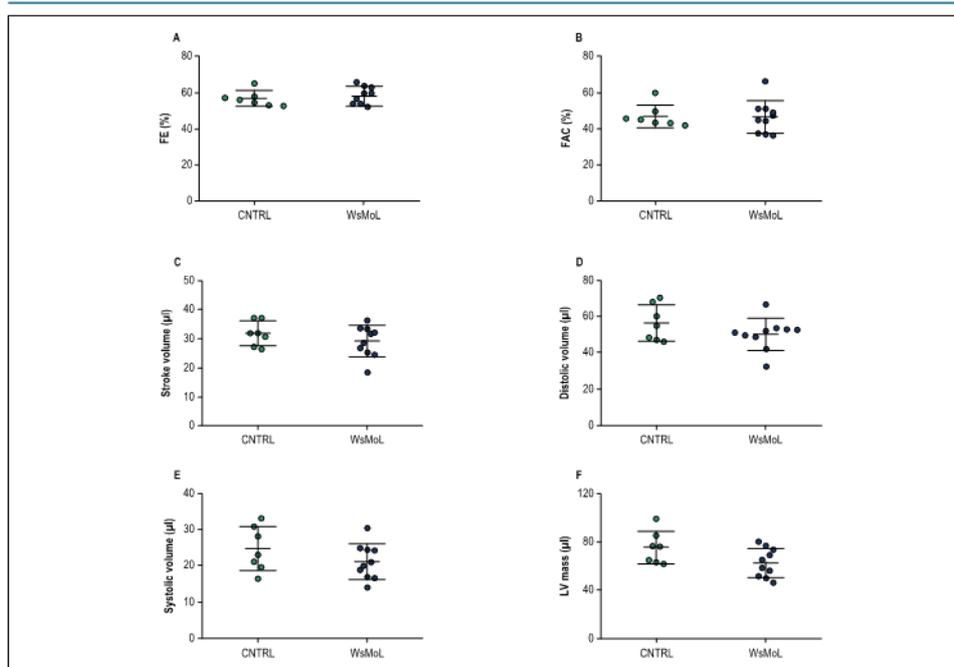


Figure 3 – Left ventricular function and structure were preserved after WSMoL treatment. The results obtained by ECHO from both groups are summarized in the following: (A) ventricular ejection fraction, (B) fractional area change, (C) stroke volume, (D) final diastolic and (E) final systolic volume, and (F) left ventricular mass (CNTRL $n = 7$ mice and WSMoL $n = 10$ mice). Comparisons between groups were performed using unpaired Student's t test. Each dot represents individual values and lines represent mean values. ○: CNTRL mice; ●: WSMoL mice. The results are shown as mean \pm SD.

action potential recordings in intact hearts. Finally, the authors thank Professor Antonio Galina from Federal University of Rio de Janeiro for his support in the mitochondrial experiments.

Author contributions

Conception and design of the research and obtaining financing: Paiva PMC, Medei E; Acquisition of data: Rodriguez de Yurre A, da Silva JDF, Torres MK, Martins EL, Ramos IP, Silva WSFL, Sarpa JS, Guedes CCS; Analysis and interpretation of the data and statistical analysis: Rodriguez de Yurre A, da Silva JDF, Martins EL, Ramos IP; Writing of the manuscript and critical revision of the manuscript for intellectual content: Rodriguez de Yurre A, da Silva JDF, Napoleão TH, Paiva PMC, Coelho LCBB, Medei E. Rodriguez de Yurre A and da Silva JDF contributed equally to this work.

Potential Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Sources of Funding

This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

Study Association

This study is associated with postgraduate program in Biological sciences and physiology of UFRJ and postgraduate program in Biochemistry and physiology of UFPE.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio de Janeiro under the protocol number DFBCICB041. All the procedures in this study were in accordance with the 1975 Helsinki Declaration, updated in 2013.

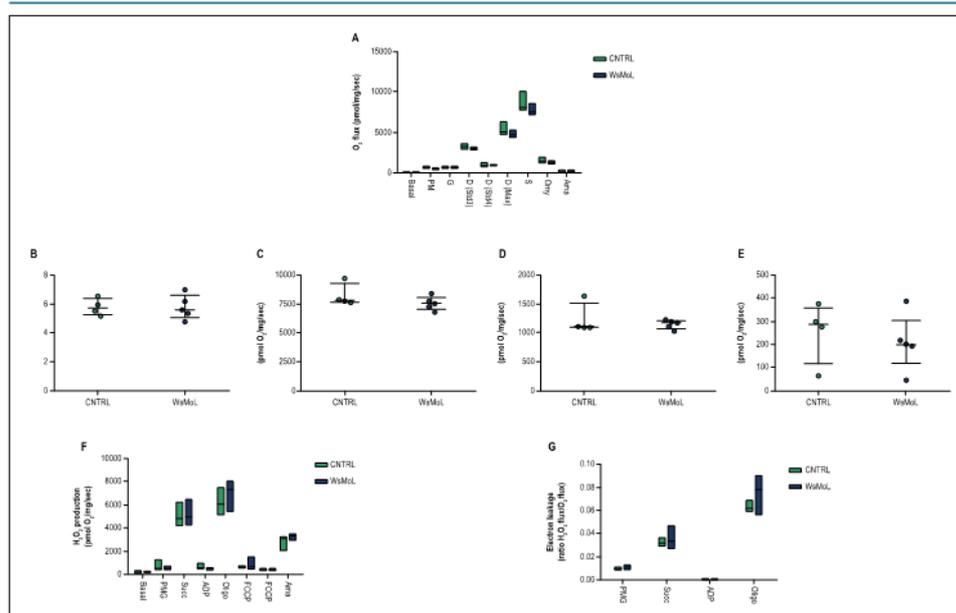


Figure 4 – WSMoL did not alter mitochondrial function after 21 days of treatment. (A) O₂ consumption fluxes in high-resolution respirometry of CNTRL and WSMoL groups, (B) respiratory control ratio (RCR), (C) maximal phosphorylative capacity of electron transport system (OXPHOS), (D) non-specific leak of protons (LEAK), (E) residual oxygen consumption (ROX), (F) rates of mitochondrial H₂O₂ production, and (G) electron leakage of CNTRL and WSMoL groups. (CNTRL n = 4 hearts and WSMoL n = 5 hearts). Each dot represents individual values and lines represent mean values. ○ : CNTRL mice; ● : WSMoL mice. Comparisons between groups were performed using unpaired Student's t test, and data that did not show Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test) were compared by the Mann Whitney test. The results are shown as mean ± SD for data with Gaussian distribution and as median and interquartile range for data with non-Gaussian distribution.

References

- Hassan FAG, Ibrahim MA. Moringa oleifera: nature is most nutritious and multi purpose tree. Int J Sci Res Publ. 2013;3(4):1-5.
- Santos A, Luz LA, Pontual EV, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB. Moringa oleifera: resource management and multiuse life tree. Adv Res. 2015;4(6):388-402.
- Sreelatha S, Jayachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by Moringa oleifera leaf extract on human cancer cells. Food Chem Toxicol. 2011;49(6):1270-5.
- Vergara-Jimenez M, Almatrafi M, Fernandez M. Bioactive components in Moringa oleifera leaves protect against chronic disease. Antioxidants. 2017;6(4):pii:E91.
- Coelho JS, Santos ND, Napoleão TH, Gomes FS, Ferreira RS, Zingali RB, et al. Effect of Moringa oleifera lectin on development and mortality of Aedes aegypti larvae. Chemosphere. 2009;77(7):934-8.
- de Oliveira CFR, de Moura MC, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB, Macedo MLR. A chitin-binding lectin from Moringa oleifera seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, Anagasta kuehniella. Pestic Biochem Physiol. 2017 Oct;142:67-76.
- Santos ND, de Moura KS, Napoleão TH, Santos GK, Coelho LC, Navarro DM, et al. Oviposition-stimulant and oviductal activities of Moringa oleifera lectin on Aedes aegypti. PLoS One. 2012;7(9):e44840.
- Ferreira RS, Napoleão TH, Santos AF, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MC, Morais MM, et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from Moringa oleifera. Lett Appl Microbiol. 2011;53(2):186-92.
- Moura MC, Trentin DS, Napoleão TH, Primon-Barros M, Xavier AS, Carneiro NP, et al. Multi-effect of the water-soluble Moringa oleifera lectin against Serratia marcescens and Bacillus sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. J Appl Microbiol. 2017;123(4):861-74.
- Moura MC, Napoleão TH, Coriolano MC, Paiva PM, Figueiredo RC, Coelho LC. Water-soluble Moringa oleifera lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. J Appl Microbiol. 2015;119(3):666-76.
- Araújo LC, Aguiar JS, Napoleão TH, Mota FV, Barros AL, Moura MC, et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from Moringa oleifera seeds. PLoS One. 2013;8(12):e81973.

12. Coriolano MC, de Santana Brito J, de Siqueira Patriota LL, de Araujo Soares AK, de Lorena VMB, Paiva PMC, et al. Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMol) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Protein Pept Lett*. 2018;25(3):295-301.
13. de Moura KS, da Silva HR, Dornelles LP, Coelho LC, Napoleão TH, de Oliveira MD, et al. Coagulant activity of water-soluble moringa oleifera lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016;180(7):1361-71.
14. Freitas JHES, de Santana KV, do Nascimento ACC, de Paiva SC, de Moura MC, Coelho LCBB, et al. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. *Chemosphere*. 2016 Nov;163:133-41.
15. Costache II, Petriș A. Cardiotoxicity of anthracyclines. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011;115(4):1200-7.
16. Iannini PB. Cardiotoxicity of macrolides, ketolides and fluoroquinolones that prolong the QTc interval. *Expert Opin Drug Saf*. 2002;1(2):121-8.
17. De Vecchis R, Ariano C, Di Biase G, Noutsias M. Malignant ventricular arrhythmias resulting from drug-induced QTc prolongation: a retrospective study. *J Clin Med Res*. 2018;10(7):593-600.
18. Li X, Wang M, Liu G, Zhou L, Wang Z, Li C. Macrolides use and the risk of sudden cardiac death. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(6):535-7.
19. Liu X, Ma J, Huang L, Zhu W, Yuan P, Wan R, et al. Fluoroquinolones increase the risk of serious arrhythmias: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(44):e8273.
20. Quinn KL, Macdonald EM, Gomes T, Mamdani MM, Huang A, Juurlink DN, et al. Macrolides, digoxin toxicity and the risk of sudden death: a population-based study. *Drug Saf*. 2017;40(9):835-40.
21. da Silva PM, de Moura MC, Gomes FS, da Silva Trentin D, Silva de Oliveira AP, de Mello GSV, et al. PgTel, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Int J Biol Macromol*. 2018 Mar;108:391-400.
22. Procópio TF, de Siqueira Patriota LL, de Moura MC, da Silva PM, de Oliveira APS, do Nascimento Carvalho LV, et al. Casul: a new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *Int J Biol Macromol*. 2017 May;98:419-29.
23. Dang L, Van Damme EJM. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry*. 2015 Sep;117:51-64.
24. Green AA, Hughes WL. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: *Methods in Enzymology*. Amsterdam: Elsevier BV; 1955.
25. Paiva PMC, Coelho LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (amaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol*. 1992;36(2):113-8.
26. Schaible TF, Scheuer J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. *J Appl Physiol*. 1979;46(4):854-60.
27. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*. 1982;243(6):H941-7.
28. Arguin C, Bourzac J-F, Placet M, Molle CM, Paquette M, Beauoin J-F, et al. The loss of P2X7 receptor expression leads to increase intestinal glucose transit and hepatic steatosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):12917.
29. Monnerat G, Alarcón ML, Vasconcelos LR, Hochman-Mendez C, Brasil G, Bassani RA, et al. Macrophage-dependent IL-1 β production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Nat Commun*. 2016 Nov;7:13344.
30. Benavides-Vallve C, Corbacho D, Iglesias-García O, Pelacho B, Albiás E, Castaño S, et al. New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction. *PLoS One*. 2012;7(7):e41691.
31. Ferreiro M, Petrosky AD, Escobar AL. Intracellular Ca²⁺ release underlies the development of phase 2 in mouse ventricular action potentials. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(5):H1160-72.
32. Mejía-Alvarez R, Manno C, Villalba-Galea CA, del Valle Fernández L, Costa R, Fill M, et al. Pulsed local-field fluorescence microscopy: a new approach for measuring cellular signals in the beating heart. *Pflug Arch*. 2003;445(6):747-58.
33. Afifouit C, Quinlan CL, Brand MD. Measurement of proton leak and electron leak in isolated mitochondria. *Methods Mol Biol*. 2012;810:165-82.
34. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
35. Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol*. 2012;810:25-58.
36. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016;79(3):629-61.
37. Lehr CM. Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1994;11(2-3):119-60.
38. Zhao YT, Wang L, Yi Z. An unusual etiology for bidirectional ventricular tachycardia. *Can J Cardiol*. 2016;32(3):395.e5-6.
39. Han SN, Yang SH, Zhang Y, Duan YY, Sun XY, Chen Q, et al. Blockage of hERG current and the disruption of trafficking as induced by roxithromycin. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91(12):1112-8.
40. Kauthale RR, Dadarkar SS, Husain R, Karande VV, Gatne MM. Assessment of temperature-induced hERG channel blockade variation by drugs. *J Appl Toxicol*. 2015;35(7):799-805.
41. Nogawa H, Kawai T, Yajima M, Miura M, Ogawa T, Murakami K. Effects of probucol, a typical hERG expression inhibitor, on in vivo QT interval prolongation in conscious dogs. *Eur J Pharmacol*. 2013;720(1-3):29-37.
42. Guo J, Zhan S, Lees-Miller JP, Teng C, Duff HJ. Exaggerated block of hERG (KCNH2) and prolongation of action potential duration by erythromycin at temperatures between 37 degrees C and 42 degrees C. *Heart Rhythm*. 2005;2(8):860-6.
43. Zhang M, Xie M, Li S, Gao Y, Xue S, Huang H, et al. Electrophysiologic studies on the risks and potential mechanism underlying the proarrhythmic nature of azithromycin. *Cardiovasc Toxicol*. 2017;17(4):434-40.
44. Singh R, Sripada L, Singh R. Side effects of antibiotics during bacterial infection: mitochondria, the main target in host cell. *Mitochondrion*. 2014 May;16:50-4.
45. Warmbrunn MV, Schilling JM, Dhanani M, Glukhov E, Gerwick LG, Gerwick WH, et al. Novel marine compounds modulate mitochondrial function in H9c2 cells: potential new pharmaceutical targets to control cardiac metabolism. *FASEB J*. 2018;32(1 suppl):702.1.

ANEXO B - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS



Water-soluble lectin (WSMoL) from *Moringa oleifera* seeds treatment recovers glycemic levels and improve left ventricular function on Type-2 Diabetes mice model.

Narendra Vera-Nuñez^{1*}, Ainhoa Rodriguez de Yurre Guirao^{1*}, José Dayvid Ferreira da Silva², Isalira Peroba Ramos³, Marília Kalinne da Silva Torres², Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho², Thiago Henrique Napoleão², Patrícia Maria Guedes Paiva², Emiliano Horacio Medei^{1,3}

¹ *Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21941-902, Rio de Janeiro - RJ, Brazil.*

² *Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

³ *National Center for Structural Biology and Bioimaging, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.*

*These authors contributed equally to this work.

Water-soluble lectin (WSMoL) from *Moringa oleifera* seeds treatment recovers glycemic levels and improves left ventricular ejection fraction on Type-2 Diabetes mice mod

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID	AABC-2020-1596.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	10-Dec-2020
Complete List of Authors:	Vera, Narendra; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho Rodríguez de Yurre, Ainhoa; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho FERREIRA DA SILVA, JOSÉ DAYVID; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica DA SILVA TORRES, MARÍLIA KALINNE; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica Ramos, Isalira Peroba Rezende; Federal University of Rio de Janeiro Barroso Coelho, Luana Cassandra Breitenbach ; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica Napoleão, Thiago; Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica Paiva, Patricia; Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica Medei, Emiliano; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Keyword:	Moringa oleifera, WSMoL, diabetes, hypoglycemic, insulin resistance, ejection fraction
Classifications:	Biomedical Sciences

<https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>