

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MÁRCIA CRISTINA GONÇALVES MACIEL

**Efeito do tratamento com *Syzygium jambolanum* sobre a sepse experimental
induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP)**

SÃO LUÍS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Efeito do tratamento com *Syzygium jambolanum* sobre a sepse experimental
induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP)**

Aluna: Márcia Cristina Gonçalves Maciel

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Dissertação apresentada ao programa de mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

SÃO LUÍS

2007

Maciel, Márcia Cristina Gonçalves

Efeito do tratamento com *Syzygium jambolanum* sobre a sepse experimental induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) / Márcia Cristina Gonçalves Maciel. 2007.

42 f.

Impressos por computador (fotocópia)

Orientadora: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2007.

1. *Syzygium jambolanum*-Efeito antibacteriano. 2. Sepse

I. Maciel, Márcia Cristina Gonçalves. II. Mestre

CDU 582.883:615.281.9

Dedico este trabalho a Deus pela
coragem e pelas vitórias que Ele
tem me concedido.

Márcia Cristina Gonçalves Maciel

**Efeito do tratamento com *Syzygium jambolanum* sobre a sepse experimental
induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP)**

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de mestrado, em
sessão pública realizada em/...../....., considera o candidato
.....

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Orientadora

Profa. Dra. Cláudia Farias Benjamim

Profa. Dra. Marilene Oliveira Rocha Borges

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

Agradecimentos

Mais uma etapa da vida foi cumprida e mais um sonho foi alcançado.

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pelo que Ele é pra mim e por tudo que Ele tem feito por mim, porque sem Ele eu não alcançaria meus objetivos, pois é Ele que me dá forças e coragem, para prosseguir e ao final de mais uma etapa eu posso dizer: “Até aqui o Senhor me ajudou”.

Agradeço à minha família, pais, irmão e ao meu noivo, Athos. Meus pais são meu alicerce desde a minha infância, com eles eu posso contar pra tudo, eles estão sempre acreditando que eu vou conseguir alcançar meus objetivos e o mais interessante disso tudo é que eles incorporam os meus sonhos como sendo deles também e estão sempre prontos a me fornecer palavras de apoio, ânimo e coragem. Ao Athos pela paciência e por estar sempre ao meu lado em tudo que eu preciso! Obrigada, amo vocês!

Agradeço a minha banca de defesa composta pelas doutoras Cláudia Benjamim, Rosane Guerra e Marilene Borges.

Os amigos, são pessoas que entram em nossas vidas, fazem parte dela, cada um tem uma personalidade, um modo de pensar e todos eles são essenciais em minha vida. Por isso, vou começar agradecendo à Éville, Suzanna e Lucilene. Nós, juntas, formamos o quarteto mais conhecido da Biologia. Obrigada meninas por todos os momentos que compartilhamos, dentre eles, momentos alegres, tristes, pequenas discussões, mas tudo serviu para fortalecer nossa amizade.

Agradeço à minha turma de Ciências Biológicas.

Agradeço à família LIF (Laboratório de Imunofisiologia da UFMA), que será minha família pra todo o sempre, pois onde eu for todos vocês vão comigo, dentro do meu coração! À dona Joana, nossa técnica de laboratório, que mantém o ambiente de trabalho sempre organizado e agradável.

Agradeço aos meus companheiros de projeto, Jardel e Michele Maluf.

Agradeço as minhas amigas do mestrado (Brigith, Maísa e Andréia).

Josias, Walmir e Paulo Vítor, amigos inesquecíveis, aos quais agradeço pela participação em meus experimentos, resultando nessa linda dissertação de mestrado.

Agradeço à Doutora Rosane Guerra, por ser essa professora que está sempre pronta a transmitir conhecimentos e que é um exemplo de pesquisadora.

E finalmente agradeço a minha orientadora, pelo seu profissionalismo e dedicação, que foram fundamentais para a realização deste trabalho, por ser uma orientadora sempre presente e que vibra com nossas vitórias. Ela faz a diferença, pois os alunos orientados por ela sempre desenvolvem trabalhos de grande qualidade. Obrigada por ser uma orientadora amiga que está sempre pronta a direcionar para o caminho do sucesso.

Enfim, agradeço a TODOS os participantes da família LIF. Essa família é muito unida, algo admirável e incomum, tudo porque é liderada por duas doutoras que são nossos exemplos de vida (Rosane Guerra e Flávia Nascimento).

Agradeço à instituição FAPEMA, Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento científico e tecnológico do Maranhão, pela bolsa de mestrado fornecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada a todos!

Sumário

	pag.
1. Introdução	01
2. Objetivos	06
2.1 Geral	06
2.2 Específicos	06
3. Material e métodos	07
3.1. Animais	07
3.2. Material vegetal	07
3.3. Ligadura e perfuração cecal	08
3.4. Avaliação da sobrevivência dos animais submetidos à CLP	08
3.5. Obtenção das células peritoneais	09
3.6. Avaliação do espriamento	09
3.7. Análise sequencial das funções de macrófagos	10
3.8. Peso dos órgãos	11
3.9. Contagem de células do baço, do linfonodo e da medula óssea	11
3.10. Ensaio biológico para quantificação do fator de necrose tumoral (TNF)	11
3.11. Concentração de glicose no sangue	12
3.12. Contagem de plaquetas	12
3.13. Avaliação histopatológica	12
3.14. Dosagem de NO no soro	13
3.15. Análise estatística	13
4. Resultados	14

4.1. Avaliação da sobrevida	14
4.2. Concentração de glicose no sangue.....	14
4.3. Avaliação do número de plaquetas.....	17
4.4. Recrutamento celular para órgãos linfóides induzido pelo tratamento com EBH	17
4.5. Peso dos órgãos.....	17
4.6. Influxo celular peritoneal induzido pelo tratamento com EBH.....	21
4.7. Corte histológico do ceco.....	21
4.8. Ativação celular peritoneal induzida pelo tratamento com EBH.....	24
4.9. Avaliação do TNF- α e nitritos séricos.....	24
5. Discussão.....	27
6. Conclusões.....	33
Referências Bibliográficas.....	34

Lista de figuras

	Pg.
Figura 1. Efeito do tratamento com EBH de <i>Syzygium jambolanum</i> na sobrevivência em animais nos quais induziu-se Ligadura e perfuração cecal (CLP) letal.....	15
Figura 2. Quantificação do nível de glicose.....	16
Figura 3. Quantificação do número de plaquetas no sangue periférico.....	18
Figura 4. Quantificação do número de células dos órgãos linfóides.....	19
Figura 5. Peso dos órgãos (mg).....	20
Figura 6. Quantificação do número de células total e diferencial na cavidade peritoneal.....	22
Figura 7. Corte Histológico histológico do ceco.....	23
Figura 8. Ativação celular peritoneal induzida pelo tratamento com EBH	25
Figura 9. Dosagem de NO e TNF- α no soro	26

Resumo

Syzygium jambolanum Lam., conhecido como jambolão possui atividade bactericida *in vitro*. Neste estudo foi avaliado o efeito do Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBH) das folhas de *Syzygium jambolanum* sobre a infecção bacteriana induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). O efeito terapêutico e/ou profilático do tratamento com EBH foi avaliado na sepse letal. A sobrevivência, o número de células dos órgãos linfóides, o número de plaquetas, a migração neutrofílica e a ativação celular foram avaliados. Foram utilizados camundongos C57Bl/6 (n=10/grupo). Os tratamentos com EBH foram feitos 6h antes, logo após ou depois de 6h da indução de CLP, por via subcutânea nas doses de 5 ou 50 mg/kg. Após 12h da indução de CLP, o sangue dos animais foi coletado para contagem de plaquetas e obtenção de soro para determinação das concentrações de TNF- α e nitritos séricos. Uma parte dos animais foi sacrificada para determinação do número de células peritoneais, determinação da produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e espraçamento. Foram coletados o baço, o linfonodo e a medula óssea. O ceco foi retirado para realização dos cortes histológicos. A outra parte dos animais foi mantida viva para acompanhamento da sobrevivência. Os resultados demonstraram que o tratamento com EBH das folhas de *S. jambolanum* aumentou a sobrevivência dos animais quando administrado antes da CLP, mas não quando administrado após a CLP. A administração de EBH antes da CLP induziu uma acentuada migração neutrofílica ao peritônio e também uma ativação dessas células, com aumento da produção de metabólitos inflamatórios. Houve uma diminuição do número de plaquetas, mas não ocorreu alteração do número de células do baço e linfonodo. Os dados obtidos sugerem que *S. jambolanum* atua de forma profilática na sepse, em decorrência de sua capacidade de induzir o recrutamento e ativação de neutrófilos.

Palavras-chave: *Syzygium jambolanum*; sepse; neutrófilos.

Abstract

The antibacterial activity of *Syzygium jambolanum* Lam., known as “jambolão” has been shown *in vitro*. It was evaluated here the effect of the treatment with hydroalcoholic crude extract (HCE) from the leaves of *S. jambolanum* on the bacteria infection induced by cecal ligation and puncture (CLP). The therapeutic and prophylactic effect of HCE treatment was evaluated in the lethal sepsis. The lifespan, the lymphoid organs cellularity, the platelets number and the neutrophil migration were evaluated. C57Bl/6 mice (n=10/group) were used. The HCE treatment by subcutaneous route was done 6h before, soon after or 6h hours after the CLP, with 5 or 50 mg/kg. After 12h of CLP, the blood was collected to platelets counting and in order to obtain the serum and evaluate the TNF- α and nitrites. A part of the mice was killed, the peritoneal cells were collected counted and cultured to evaluate the hydrogen peroxide release, nitric oxide production and spreading ability. The spleen, lymph node and bone marrow cells were also counted. Another part of the animals was maintained alive to evaluate the lifespan. The results showed that the HCE treatment increased the lifespan when administrated before, but not after the CLP. There was an intense neutrophil migration and also an increase on the inflammatory mediators production. The number of platelets number was decreased in groups treated with the high dose of HCE, but there was no alteration in the number of cells in lymphoid organs. Those data suggest that *S. jambolanum* can be used as prophylactic in the sepsis, due its ability to induce neutrophil recruitment and cellular activation.

Keywords: *Syzygium jambolanum*; Sepsis; Neutrophil.

1. *Introdução*

A sepse severa e o choque séptico estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos neutropênicos, pacientes hospitalizados e em indivíduos imunossuprimidos. Afetam cerca de 700 mil pessoas por ano (Riedemann et al., 2003; Paes, 2004). A sepse é uma síndrome clínica complexa decorrente de uma resposta do hospedeiro a um processo infeccioso, o qual ocasiona uma resposta inflamatória exarcebada. A evolução da sepse resulta em destruição múltipla dos órgãos, coagulação intravascular disseminada (DIC), síndrome do desconforto respiratório agudo e morte (Riedmann et al., 2003).

A resposta inflamatória sistêmica tem sido reconhecida como fator proeminente na mortalidade induzida pela sepse (Calandra; Cohen, 2005). As manifestações clínicas da sepse, tais como febre, hipercoagulação e hipotensão periférica são derivadas da liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (Benjamim et al., 2000; Benjamim, 2001). Além disso, existem evidências de que a sepse prejudica o funcionamento do sistema imune, interferindo na resposta imune inata e potencializa apoptose dos linfócitos (Docke et al., 1997; Riedemann et al., 2002; Hotchkiss; Karl, 2003).

Durante o processo infeccioso, os neutrófilos, as primeiras células a migrarem para o local da infecção, aumentam seu número próximo às vênulas pós-capilares, atravessam a barreira endotelial por diapedese e atingem a área de infecção. Dessa forma, são capazes de ampliar a resposta inflamatória (Bone, 1991), eliminando os microorganismos pela liberação de agentes bactericidas, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, os neutrófilos liberam citocinas e quimiocinas as

quais aumentam o recrutamento e ativação dessas e de outras células imunológicas (Yamashiro et al., 2001).

O recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso é extremamente importante para o controle local de crescimento bacteriano e, conseqüentemente, para a prevenção da disseminação bacteriana (Benjamim et al., 2000; 2002; Alves-Filho et al., 2005). A falha na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório é observada na sepse letal induzida por endotoxemia, como por exemplo, pela inoculação de *Staphylococcus aureus* (Crossara-Alberto et al., 2002) e por ligadura e perfuração cecal (Benjamim et al., 2000). Esse fenômeno resulta no aumento do número de bactérias na cavidade peritoneal e no sangue, fato que está associado à elevada taxa de mortalidade. Por outro lado, na sepse sub-letal, a infecção bacteriana é restrita a cavidade peritoneal, a migração neutrofílica não é suprimida e não se observa uma mortalidade significativa (Benjamim et al., 2000; 2002; Crossara-Alberto et al., 2002; Rios-Santos et al., 2003).

A erradicação de microorganismos por neutrófilos e macrófagos depende em grande parte da sua capacidade fagocítica (Segal, 2005) e posterior geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o “burst” ou explosão respiratória. As ERO são produzidas no interior dos fagossomos por uma série de reações iniciadas pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase, que produz formas ativas de oxigênio incluindo radicais superóxidos e peróxidos, fundamentais na eliminação de bactérias fagocitadas (Babior, 1984; 1999; Iazetti; Mantovani, 1998).

Estudos *in vivo* e *in vitro* comprovam que há adesão de leucócitos às células endoteliais e que o óxido nítrico (NO) está envolvido na migração neutrofílica (Hickey ; Kubes, 1997; Hickey et al., 1997; Hickey, 2001).

Os mecanismos envolvidos na falha da migração neutrofílica não estão completamente compreendidos, mas podem ser decorrentes de uma excessiva liberação

de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e um concomitante aumento de NO derivado da NO sintase induzível (iNOS) (Tavares-Murta et al., 1998; 2001).

O NO apresenta efeitos vasodilatadores benéficos ao sistema microvascular, mas também pode estar envolvido na produção de radicais citotóxicos quando em associação com EROS, podendo gerar o ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio iniciando a peroxidação lipídica e potencializando a lesão inflamatória em células vasculares (Beckman et al., 1990; Oeckler; Wolin, 2000).

Os modelos experimentais de sepse conhecidos são: administração endovenosa ou intraperitoneal de bactérias vivas ou de componentes microbianos e o modelo de injúria com consecutiva liberação da microbiota intestinal por ligadura e perfuração cecal (CLP) ou introdução de cateter no cólon ascendente. O modelo utilizado neste trabalho foi o de CLP, por ser um modelo de injúria semelhante ao quadro de sepse em humanos, sobretudo decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo colônico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (Witchermann et al., 1980; Baker et al., 1983; Benjamim, 2001).

Recentemente foi demonstrado que Liu-Shen-Wan, uma espécie vegetal utilizada na medicina chinesa tradicional, reduziu a mortalidade por sepse decorrente de CLP em camundongos. Este efeito foi relacionado à limitação da resposta inflamatória sistêmica e a alterações imunológicas no sítio infeccioso primário (Ma et al., 2006).

De fato, diversas plantas têm sido empregadas pela população para o tratamento de doenças infecciosas, causadas por bactérias (Scalbert, 1991; Nascimento et al., 2000; Loguercio et al., 2005), fungos (Nascimento et al., 2000) e vírus (Kusumoto et al., 1995; Vermani; Garg, 2002). Dentre estas se inclui *Syzygium jambolanum* DC.

(sinonímias: *Eugenia jambolana* Lam., *Syzygium cumini* Skeels., *Myrtus cumini* L., *Eugenia cumini* Druce) (Mazantti et al., 2003; Loguercio et al., 2005).

Syzygium jambolanum, espécie pertencente à família Myrtaceae, é conhecida popularmente por jambolão, azeitona doce, jamelão, jambul e jambeiro (Garcia et al., 2003; Mazantti et al., 2003; Schossler et al., 2004; Loguercio et al., 2005). É oriunda da Índia Oriental, mas encontra-se aclimatada no Brasil, principalmente em regiões litorâneas, de climas quentes e úmidos. Localiza-se nos estados do Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (Mazantti et al., 2003).

Algumas atividades biológicas têm sido descritas para essa espécie tais como: efeito hipoglicemiante (Prince et al., 1998; Teixeira et al., 2000; Soares et al., 2000; Grover et al., 2000), ação hipotensora (Romero, 1995; Ribeiro, 2007), atividade antiinflamatória (Muruganandan et al., 2001) e propriedades anti-alérgicas (Brito et al., 2007).

Além disso, Shafi et al. (2002) e Chamdrasekaram; Venkatesalu (2004) mostraram que o extrato das folhas de *S. jambolanum* apresenta atividade antifúngica e antimicrobiana *in vitro* inibindo o crescimento de *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella thyphimurium*.

A análise fitoquímica das folhas secas e frescas de *S. jambolanum* indicou que há uma grande quantidade de saponinas e taninos, associados à atividade antimicrobiana tanto para microorganismos Gram-positivos quanto para Gram-negativos (Scalbert, 1991; Chandrasekaran; Venkatesalu, 2004).

Ensaio biomonitorados demonstram que as saponinas apresentam atividade mucolítica, expectorante, diurética, anti-séptica, laxativa antimicrobiana,

antiinflamatória e aumentam a permeabilidade das membranas, o que poderia explicar o uso popular no controle da hipertensão arterial (Loguercio et al., 2005).

Os taninos apresentam amplo espectro de atividades biológicas, atuam como anti-séptico, possuem atividade antimicrobiana e anti-hemorrágica. Além disso, precipitam proteínas do plasma, ativam os fatores de coagulação sanguínea, são vasoconstritores, anti-diarréicos e apresentam atividade cicatrizante, inclusive nos casos de queimadura tanto da pele, quanto das mucosas, devido a capacidade que apresentam de formar uma película protetora na região lesionada, possibilitando sua reepitelização (Loguercio et al., 2005).

Dessa forma, o propósito deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento do extrato hidroalcolico (EBH) das folhas de *S. jambolanum* na sepse letal induzida por CLP em camundongos. Este modelo foi escolhido por ser semelhante a situações clínicas de perfuração intestinal que resultam em infecção bacteriana em humanos.

2. Objetivos

2.1. Geral:

Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico (EBH) de folhas de *Syzygium jambolanum* em camundongos submetidos à sepse letal.

2.2. Específicos:

- Acompanhar a sobrevivência dos animais tratados com EBH antes (profilático) ou após (terapêutico) a indução de CLP.
- Quantificar a migração e atividade neutrofílica nos animais tratados com EBH.
- Quantificar o número de células dos órgãos linfóides e plaquetas.
- Avaliar os órgãos vitais dos animais tratados ou não com EBH.
- Determinar a concentração de glicose, TNF- α , NO e H₂O₂ em animais submetidos à sepse.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os camundongos foram mantidos com água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais realizados seguiram os princípios técnicos e éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão.

3.2. Material vegetal

As folhas do *Syzygium jambolanum* DC. (Myrtaceae) foram coletadas dia 7 de abril de 2005 no período matutino no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (São Luís, MA, Brasil) onde foi identificada e está depositada a exsicata sob o número 1087.

As folhas frescas (200 g) foram trituradas, colocadas em maceração com 1L de etanol (70%) e agitadas a cada 8h, durante 24h. Depois desse período o extrato hidroalcolico foi filtrado e o mesmo procedimento foi repetido quatro vezes. Em seguida, o produto das quatro extrações foi misturado e concentrado sob baixa pressão. Finalmente, o extrato foi liofilizado e considerado como Extrato Bruto Hidroalcolico (EBH). O rendimento obtido foi de 5, 11%.

Para o experimento *in vivo* o resíduo seco liofilizado, foi diluído em soro fisiológico (NaCl à 0,9%) a uma concentração de 1 mg/mL. Os animais foram pesados e as doses do EBH foram ajustadas para 5 e 50 mg/Kg (mg de material seco da planta / Kg de peso dos animais).

3.3. Ligadura e perfuração cecal

A sepse polimicrobiana foi induzida usando o modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) conforme descrito por Benjamim et al. (2000; 2002). Os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg). Em seguida foi feita a laparotomia. O ceco foi mobilizado, ligado abaixo da válvula ileocecal e perfurado 8 vezes com agulha de calibre 18G para a indução da sepse letal. O ceco foi colocado novamente na cavidade peritoneal e o abdome foi suturado. Ao final do procedimento foi administrada solução salina estéril (0.5 mL/10g de peso corpóreo), via subcutânea, como fluido de ressuscitação, com a finalidade de prevenir a hipotensão pós-operatória (Wichtermann et al., 1980; Baker, 1983; Hyde et al., 1990; Benjamim et al., 2002).

3.4. Avaliação da sobrevivência dos animais submetidos à CLP

Os camundongos foram divididos em 11 grupos (n=10 animais/grupo). No grupo 1, denominado Sham, os camundongos foram operados, porém o ceco não foi perfurado. No grupo 2 denominado Controle, os camundongos receberam uma injeção de solução salina estéril, logo após a CLP. Nos grupos 3, 4 e 5 denominados Antibiótico, os animais receberam uma injeção de Ampicilina Sódica na concentração de 6%, 6 h antes, logo após ou 6 h depois da CLP, respectivamente. Os grupos 6 e 7 foram submetidos ao tratamento com EBH (5 e 50mg/Kg, respectivamente) administrado 6h antes da CLP. Nos grupos 8 e 9, o tratamento com EBH foi administrado logo após a CLP. Nos grupos 10 e 11, o tratamento com EBH foi administrado 6h após a indução da CLP.

Todos os tratamentos foram administrados via subcutânea. A mortalidade dos animais foi acompanhada a cada 12h até o quinto dia após a indução da sepse.

Nos experimentos subseqüentes, o tratamento com EBH foi feito 6h antes da CLP e os animais foram sacrificados 12h após indução de sepse por CLP.

3.5. *Obtenção das células peritoneais*

Os camundongos foram sacrificados 12h após a indução de sepse por CLP e as células peritoneais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 6 mL de Solução tamponada de fosfato (PBS) estéril gelada. Para a determinação do número total, as células peritoneais foram coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1. As células foram contadas com auxílio de um hemocitometro (Sigma, St. Louis, MO, USA). A contagem diferencial foi realizada com auxílio da câmara de Suta e as células foram coradas com auxílio do kit Instant-Prov (Newprov, Pinhais, Brazil) (Cruz et al., *in press*). A contagem das células foi feita com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

3.6. *Avaliação do espreiamento*

A técnica de espreiamento foi realizada de acordo com Rabinovitch et al., (1977). As suspensões contendo 2×10^6 células peritoneais foram centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de PBS Dulbecco's contendo 5 mM de glicose. Foram colocados 50 μ L da suspensão celular em lâminas de vidro que foram incubadas por 1h a 37°C. Em seguida, as lâminas de vidro foram enxaguadas em PBS. As células aderentes foram fixadas com glutaraldeído a 2.5% e examinadas com auxílio de um microscópio de contraste de fase em aumento de 400x.

O índice de células espreiadas (SI) foi calculado da seguinte maneira: $SI = (\text{número de células espreiadas} \times 100) / 200$, i.e. $SI = \%$ de células espreiadas, considerando o total de 200 células.

3.7. *Análise sequencial das funções de macrófagos*

A produção de H_2O_2 e NO foi determinada em uma amostra única de células usando o método previamente descrito por Nascimento et al., (2003). Para avaliar a liberação de H_2O_2 , utilizou-se o método de oxidação dependente do vermelho de fenol (Pick; Mizel, 1981). Dois milhões de células peritoneais foram ressuspensas em 1 mL de solução vermelho de fenol, preparada na hora do ensaio. A solução consistiu de PBS Dulbecco's contendo 5.5 mM dextrose, 0.56 mM vermelho de fenol (Sigma) e 8.5 U/mL de peroxidase II (Sigma); 100 μ L da suspensão celular foram adicionados em poços de uma placa de microtitulação e incubados na presença ou ausência de estímulo com 10 ng de acetato miristato de forbol (PMA) (Sigma), por 1 h, a 37°C, em câmara úmida contendo 5% CO_2 e 95% de ar. As placas foram centrifugadas uma vez a 150 g por 3 minutos e o sobrenadante foi coletado e transferido para outra placa. A reação foi finalizada com 10 μ L de NaOH 1N. A absorbância foi mensurada a 620 nm em leitor de microplacas (MR 5000, Dynatech Laboratories Inc., Gainesville, VA, USA). A conversão da absorbância para μ M de H_2O_2 foi feita pela comparação com a curva padrão obtida com concentrações conhecidas de H_2O_2 (5 a 40 μ M) como previamente descrito por Pick; Keisary (1980).

Em seguida as placas contendo as células peritoneais foram lavadas três vezes com PBS. As células aderentes foram cultivadas em presença de 100 μ L de meio RPMI 1640 completo suplementado com 10 mM HEPES, 11 mM bicarbonato de sódio, 100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 23 mM L-asparagina, 1 mM ácido fólico, 0.1 mM ácido piruvico e 5% soro fetal bovino (SFB), por 48 h, a 37°C, em estufa de 5% CO_2 e 95% ar. Após esse período, 50 μ L de sobrenadante foram coletados e incubados com igual volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida/0.1% dihidroclorido diamino naftaleno / 2.5% H_3PO_4) por 10 min, a temperatura ambiente,

para quantificar o acúmulo de nitrito (Ding et al., 1988). A absorvância foi determinada a 550 nm. A conversão da absorvância para μM de NO foi feita pela comparação com a curva padrão obtida com concentrações conhecidas (5-60 μM) de nitrato de sódio diluído em meio RPMI completo.

3.8. Peso dos órgãos

O fígado, baço, linfonodo inguinal foram retirados e pesados com auxílio de balança digital (Marte).

3.9. Contagem de células do baço, do linfonodo e da medula óssea

As células do linfonodo inguinal, baço e medula óssea foram obtidas das seguintes formas: o fêmur foi perfundido com 1 mL de PBS para obtenção das células da medula óssea; o baço e o linfonodo foram triturados e as células resultantes foram lavadas com 5 mL e 1 mL de PBS, respectivamente. Para determinar o número total de células, nove volumes de células peritoneais foram adicionados a 1 volume de cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30%. As células foram contadas com auxílio de um hemocitometro (Sigma) em microscópio óptico de luz comum.

3.10. Ensaio biológico para quantificação do Fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF sérico foi quantificado utilizando-se ensaio de citotoxicidade com células tumorais L929 tratadas com actinomicina D (Flick; Gifford, 1984).

As células L929 ($3, 5 \times 10^4$ /poço) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com antibiótico e L-glutamina (2 mM) e 5% FCS (Sigma) à 37°C em estufa úmida com 5% CO_2 . Depois de 20 h as amostras foram diluídas em presença de actinomicina D (2 $\mu\text{g/mL}$). Após 20 h de incubação, as células residuais viáveis foram fixadas e coradas

com cristal violeta 0,1% e ácido acético 6% por 10 min. O excesso de corante foi removido com água corrente e em seguida as placas foram colocadas para secar. Um volume de 100 µL de metanol foi adicionado a cada poço para dissolver o corante. A absorvância foi determinada em leitor com microplacas a 620nm. A unidade lítica (UL) de TNF foi calculada a partir da diluição que induziu 50% de lise das células L929.

3.11. Concentração de glicose no sangue

A quantificação de glicose foi feita no sangue periférico após 6h de tratamento com EBH e 12h da CLP usando glicosímetro digital (ADVANTAGE II – ROCHE). O valor obtido representa a concentração da glicose (mg/dL).

3.12. Contagem de Plaquetas

Alíquotas de 20 µL de sangue periférico, obtido por punção retro-orbital foram coletados em tubo de hemólise contendo 4mL da solução diluidora (3,8 g de citrato de sódio, 2 mL de formol, 100 mL de água destilada). O conteúdo do tubo foi homogeneizado por 2 min e uma alíquota de 10 µL foi transferida para a câmara de Neubauer. A câmara ficou em repouso por 10 min e em seguida a contagem do número de plaquetas (plaquetas/mm³) foi avaliada em microscópio óptico de luz comum.

3.13. Avaliação Histopatológica

Para avaliar a migração neutrofílica para a parede do ceco dos camundongos submetidos a sepse, três animais de cada grupo Sham, Controle, EBH 5 e EBH 50 mg/kg foram sacrificados. Fragmentos do ceco foram removidos, fixados em formol 10% por 24 h, desidratados em álcool e embebidos em parafina. Fragmentos de 5-mm foram corados em hematoxilina – eosina para análise histopatológica da resposta inflamatória,

que foi determinada em teste duplo cego a partir da seguinte classificação: - sem infiltrado; + moderado; ++ intenso; +++ muito intenso.

3.14. Dosagem de óxido nítrico no soro

Alíquotas de 200 μ L de soro foram desproteínicas na presença de 20 μ L de cloreto de zinco 1 M. Após o preparo das amostras, estas foram centrifugadas à 14.000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido para dosagem de nitrito como forma indireta de avaliar a produção de óxido nítrico, conforme protocolo adaptado de Miranda et al. (2001).

3.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M de 10 animais/grupo. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad versão 3.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Utilizou-se Análise de Variância ANOVA One-way seguido do teste de Newman-Keuls, com nível de significância de 0,05%. A sobrevivência dos camundongos foi demonstrada usando a curva de Kaplan-Meier e o teste de log-rank foi aplicado para comparar as curvas.

4. Resultados

4.1. Avaliação da sobrevivência

A ligadura e perfuração cecal foi realizada nos animais e a sobrevivência foi acompanhada durante 120h. Os diferentes tempos de tratamento com EBH das folhas de *Syzygium jambolanum*: logo após a indução da sepse (Figura 1A), 6 horas depois da indução sepse (Figura 1B) e 6 h antes (Figura 1C) da indução da sepse foram comparados.

A sobrevivência dos animais do grupo Controle foi de 25%, a partir das 24h, mantendo-se estável até o quinto dia. O tratamento com antibiótico logo após a CLP manteve uma sobrevivência de 66,6% a partir das 48h mantendo-se estável até o quinto dia. Entretanto, todos os animais dos grupos EBH 5 e EBH 50 morreram após 72h e 48h, respectivamente (Figura 1A). No tratamento realizado 6h depois da sepse, a sobrevivência dos animais dos grupos Controle e EBH 5 foi de 25% e do grupo EBH 50 foi de 50 % (Figura 1B). Por outro lado, o tratamento feito 6h antes da CLP manteve a sobrevivência de 100% dos animais tratados com as duas doses do EBH em todo o período avaliado (Figura 1C).

4.2. Concentração de glicose no sangue

A glicemia de todos os animais foi avaliada antes dos tratamentos e 6 h após o tratamento com o extrato ou doze horas após a CLP.

A CLP induziu por si, uma significativa redução na concentração sanguínea de glicose nos animais dos grupos Controle, EBH 5 e EBH 50 quando comparados ao grupo Sham. Entretanto, o tratamento com EBH não alterou significativamente a concentração de glicose quando comparado com os animais do grupo Controle (Figura 2).

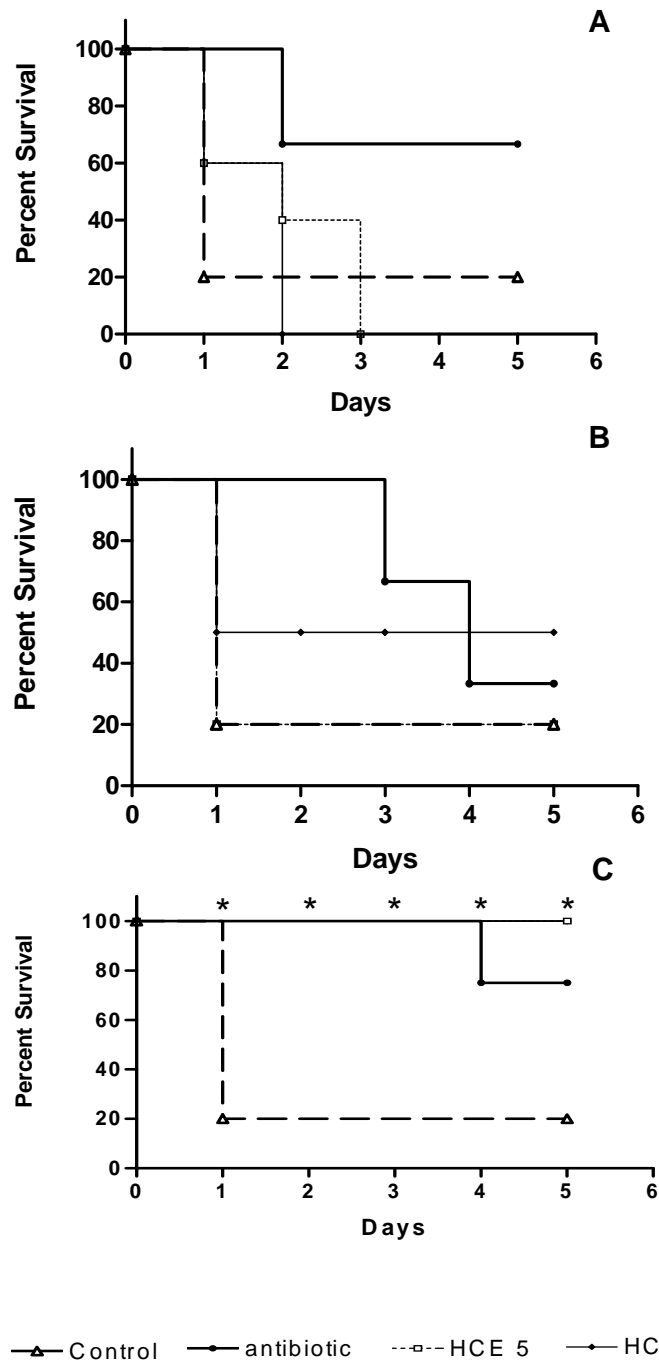


Figura 1. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* na sobrevida de animais submetidos à CLP letal. O ceco foi perfurado 8 vezes com agulha 18G. O tratamento foi feito logo após (A), 6 horas depois (B) ou 6 horas antes da indução da sepse (C). A sobrevida dos animais foi observada até o quinto dia. Os resultados foram expressos com média \pm S.E.M de 10 animais/grupo. * $p \leq 0,05$ em relação ao Controle.

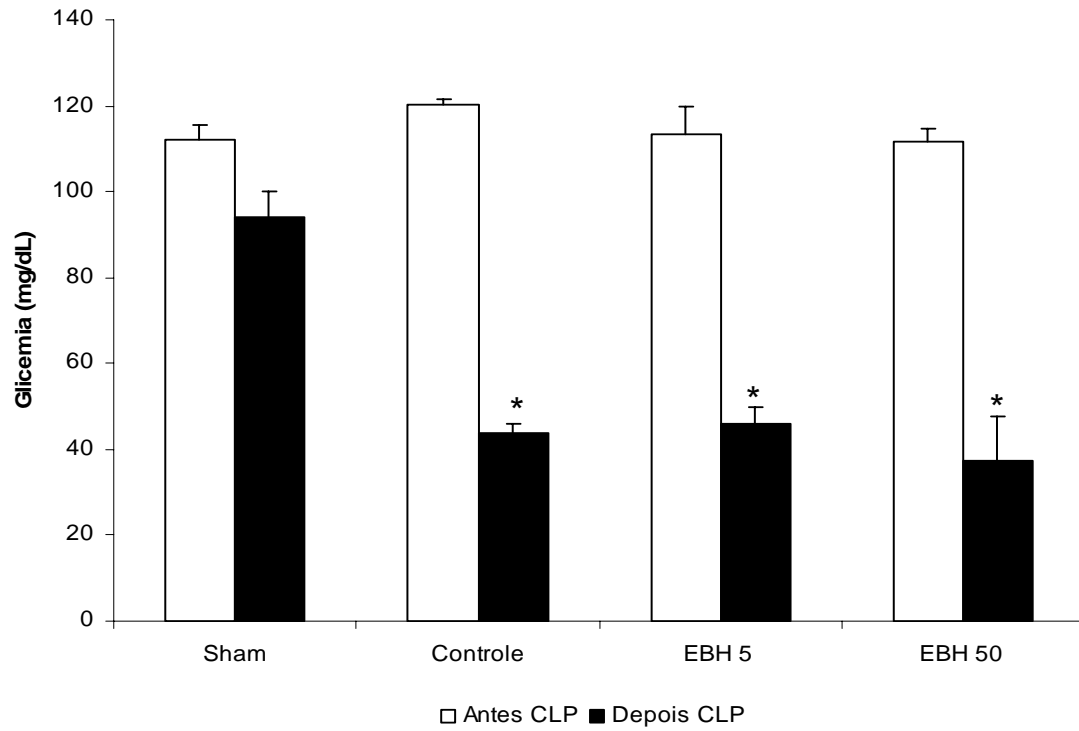


Figura 2. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* sobre o nível de glicose sanguínea. Foi avaliado antes e 12h após a CLP. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M de 10 animais/grupo. * $p \leq 0,05$ em relação ao Sham.

4.3. Avaliação do número de plaquetas

A Figura 3 mostra que somente o tratamento com EBH na maior dose (50mg/Kg) diminuiu significativamente o número de plaquetas quando comparado com os grupos Sham, Controle e EBH 5.

4.4. Recrutamento celular para órgãos linfóides induzido pelo tratamento com EBH

O tratamento com EBH nas doses de 5 e 50 mg/kg induziu uma diminuição significativa no número de células da medula óssea em relação aos grupos Sham e Controle (Figura 4A).

Não houve alterações quanto ao número de células esplênicas (Figura 4B).

O número de células do linfonodo aumentou nos grupos Controle, EBH 5 e EBH 50 quando comparados ao Sham (Figura 4C). Entretanto, não houve diferença entre os grupos tratados com EBH e o controle.

4.5. Peso dos órgãos

Não houve diferença estatística no peso do linfonodo (Figura 5A) e do baço (Figura 5B) entre os grupos.

Entretanto, houve diferença significativa no peso do fígado. O peso do fígado do grupo Controle aumentou em relação ao grupo Sham; o grupo EBH 5 diminuiu o peso do fígado em comparação com o grupo Sham e Controle; o peso do fígado do grupo EBH 50 foi maior que o do grupo EBH 5 (Figura 5C).

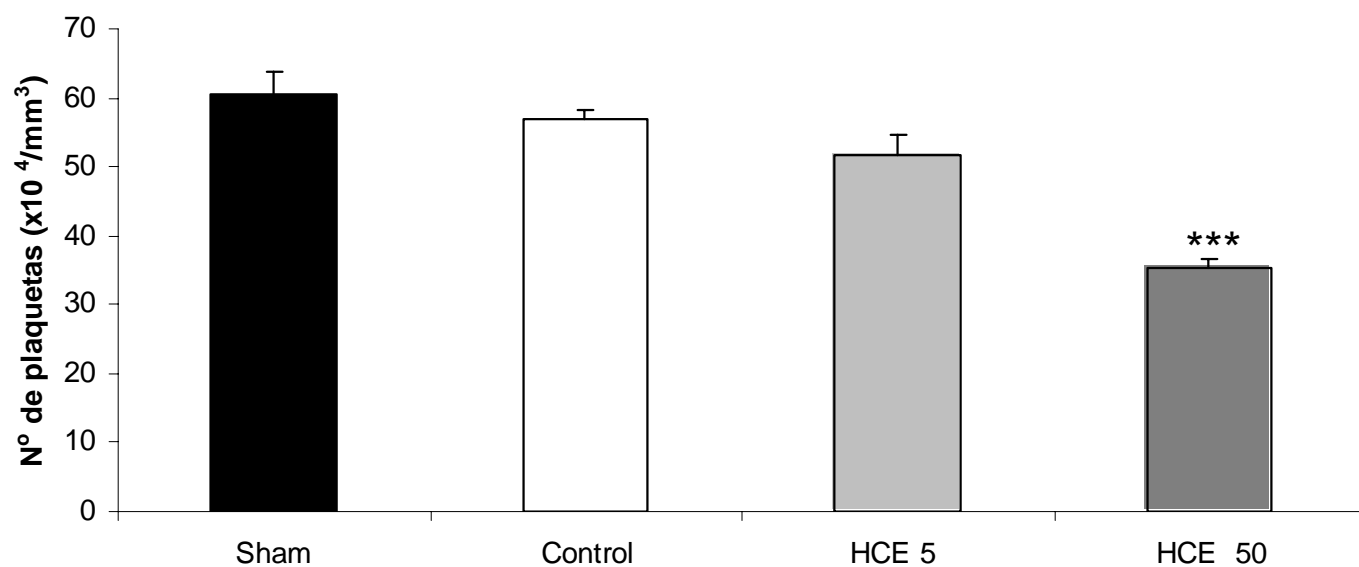


Figura 3. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* sobre o número de plaquetas no sangue periférico. Os resultados foram expressos com média \pm S.E.M de 10 animais/grupo. *** $p \leq 0,05$ em relação aos grupos Sham, Controle e EBH 5.

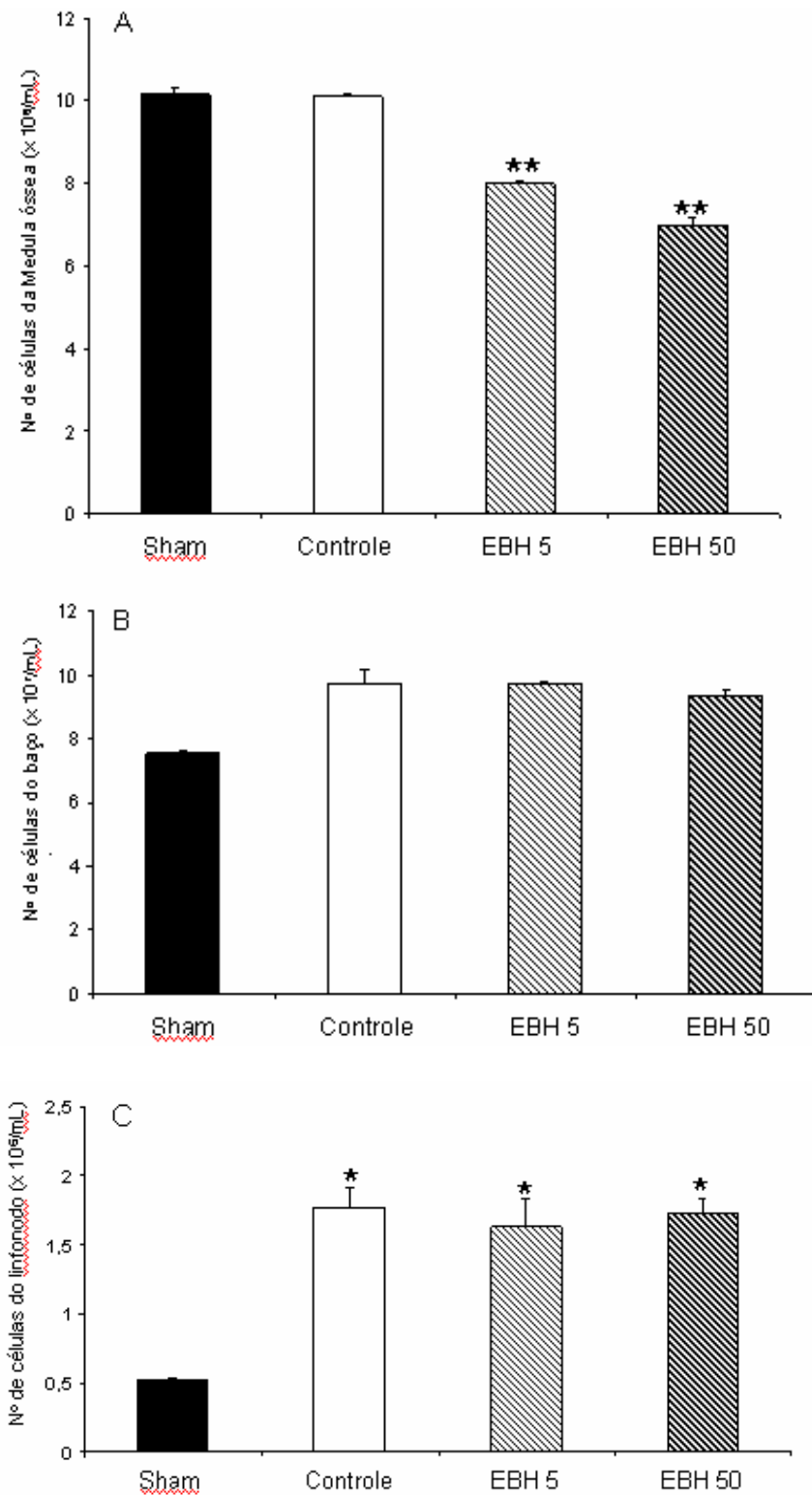


Figura 4. Efeito do tratamento com EBH dos órgãos linfóides. As células a medula óssea (A), baço (b) e linfonodo (C) foram quantificadas 12h após a CLP. Os resultados foram expressos com média \pm S.E.M de 10 animais/grupo. * $p \leq 0,05$ em relação ao Sham; ** $p \leq 0,05$ em relação ao Sham e ao Controle.

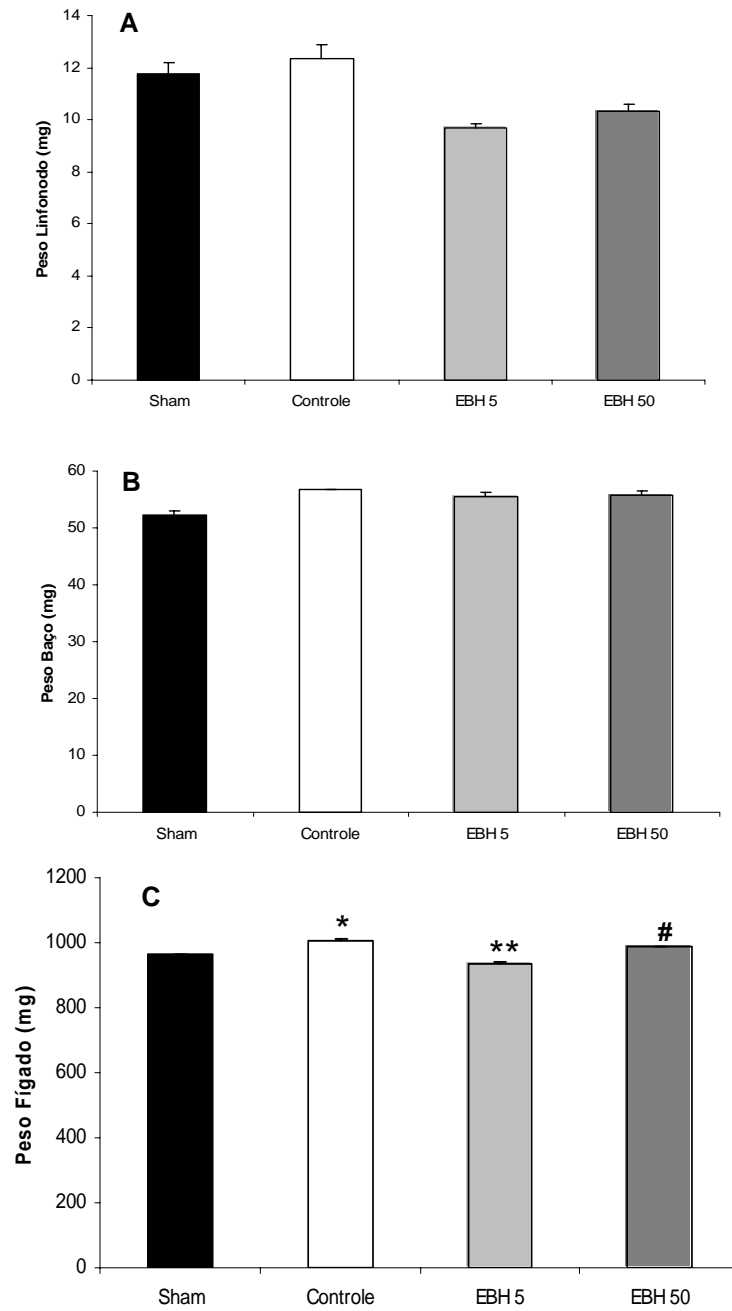


Figura 5. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* sobre o peso do linfonodo (A), Baço (B) e fígado (C). Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M de 10 animais/grupo. * $p \leq 0,05$ em relação ao Sham; ** $p \leq 0,05$ em relação ao Sham e ao Controle; # $p \leq 0,05$ em relação ao EBH 5.

4.6. Influxo de células ao peritônio induzido pelo tratamento com EBH

A ligadura e perfuração cecal induziu um aumento significativo na migração de células para a cavidade peritoneal. O número de células totais foi maior no grupo Controle e nos grupos tratados com as duas concentrações de EBH quando comparados ao grupo Sham. Além disso, o número de células totais do grupo EBH 5 foi maior que o do grupo Controle.

O número de macrófagos aumentou significativamente no grupo Controle e nos dois grupos tratados com EBH quando comparados ao grupo Sham, porém o número de macrófagos dos grupos tratados diminuiu em relação ao Controle.

O número de neutrófilos foi maior nos grupos tratados com EBH quando comparado aos grupos Sham e Controle. Além disso, o grupo EBH 50 apresentou um número maior de neutrófilos que o grupo EBH 5 (Figura 6).

4.7. Infiltrado inflamatório no ceco

Realizou-se corte histológico do ceco dos animais dos grupos Sham, Controle, EBH 5 e EBH 50 a fim de avaliar o infiltrado inflamatório para a parede do ceco dos camundongos submetidos à CLP.

O grupo Sham apresentou infiltrado neutrofílico moderado (Figura 7A). No grupo Controle (Figura 7B) houve um infiltrado intenso. Nos grupos EBH 5 e EBH 50 (Figuras 7C e 7D), o infiltrado neutrofílico foi muito intenso.

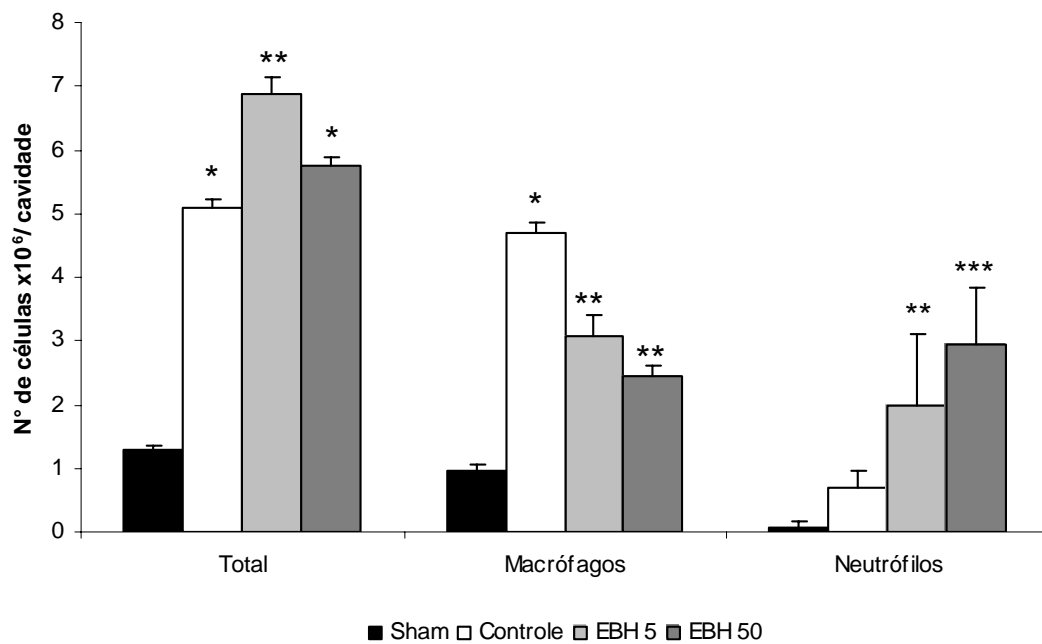


Figura 6. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* sobre a Contagem total e diferencial de células na cavidade peritoneal. O lavado peritoneal foi colhido 12h após a CLP. Os resultados foram expressos como média \pm S.E.M de 10 animais/grupo. * $p \leq 0,05$ em relação ao Sham; ** $p \leq 0,05$ em relação ao Sham e ao Controle; *** $p \leq 0,05$ em relação ao Sham, Controle e EBH 5.

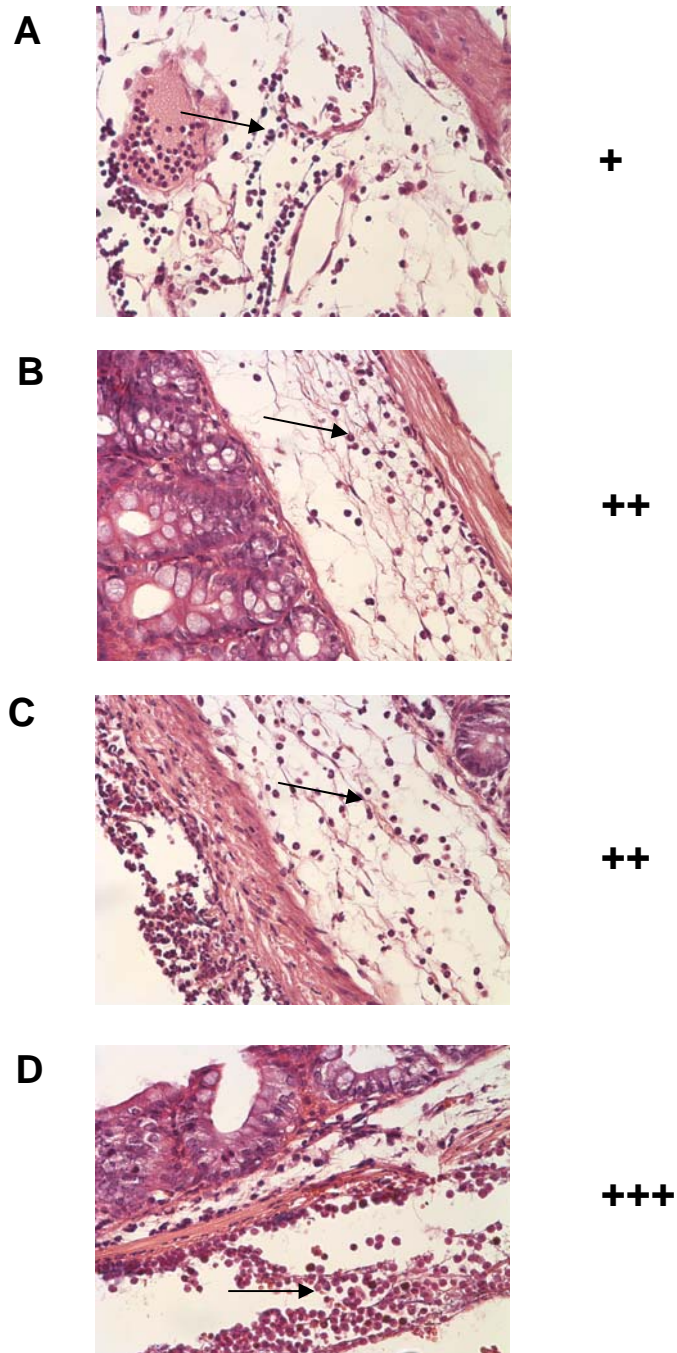


Figura 7. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* sobre a migração de células inflamatórias no ceco. O ceco dos animais do grupo Sham (A), Controle (B), EBH 5 (C) e EBH 50 (D) foi retirado para avaliação histológica . As setas indicam o infiltrado inflamatório. 400x.

4.8. Ativação celular peritoneal induzida pelo tratamento com EBH

O tratamento com EBH nas doses de 5 e 50 mg/kg aumentou significativamente o espraçamento de células peritoneais em comparação ao grupo Sham. Entretanto, apenas o grupo EBH 50 apresentou aumento no espraçamento quando comparado ao grupo Controle, sendo diferente também no grupo EBH 5 (Figura 8A). Em relação à liberação de peróxido de hidrogênio, o tratamento com EBH nas duas doses induziu um aumento significativo quando comparado ao Sham e Controle (Figura 8B).

O tratamento com EBH nas doses de 5 e 50 mg/kg aumentou significativamente a produção de NO em relação ao grupo Sham, mas apenas o grupo EBH 50 aumentou de forma significativa a produção de NO em relação ao Controle.

4.9. Avaliação da concentração de TNF- α e nitritos séricos

A concentração de nitritos no soro dos animais de todos os grupos foi maior quando comparado ao Sham. A concentração de nitrito no soro nos animais do grupo EBH 5 foi menor que o Controle. Entretanto, o EBH 50 apresentou efeito contrário (Figura 9A).

A concentração de TNF sérico foi menor no grupo EBH 5 quando comparado ao controle e ao EBH 50 (Figura 9B).

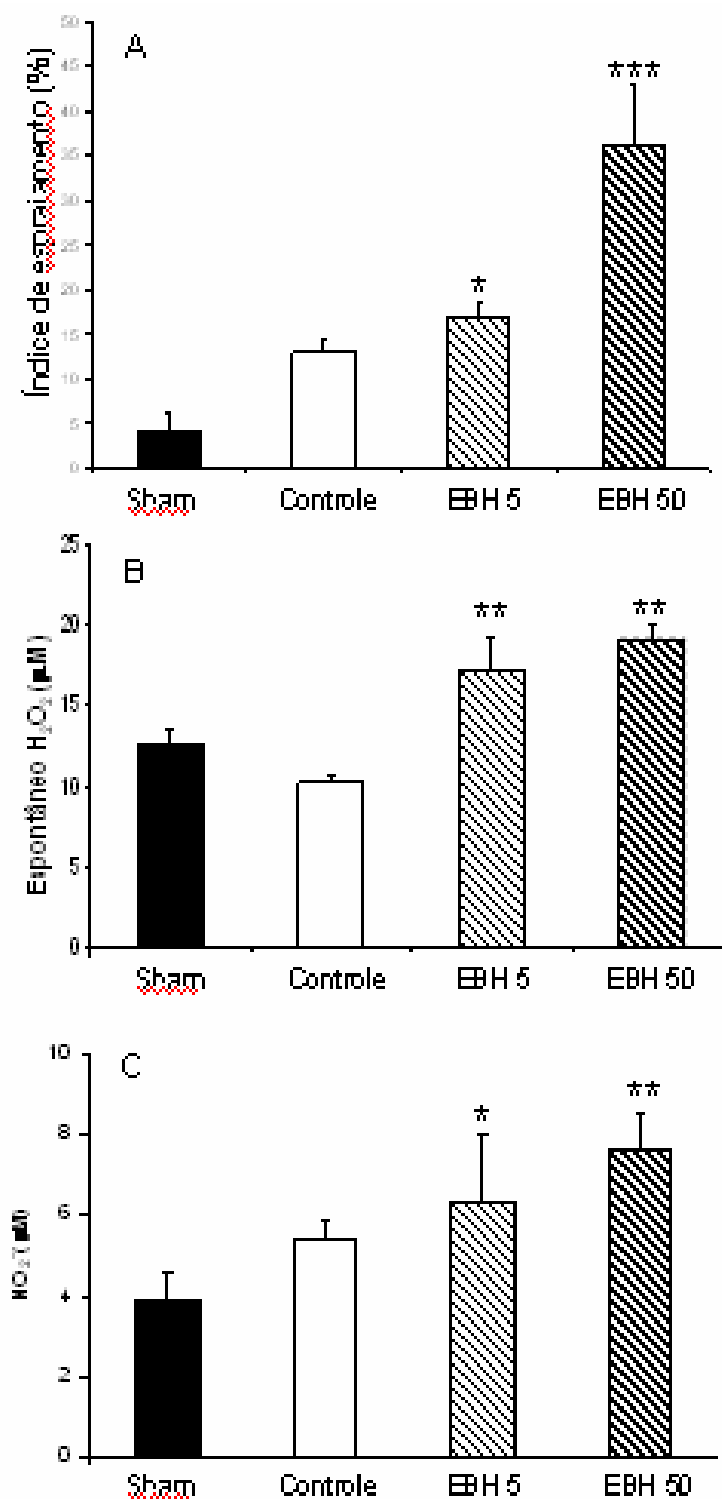


Figura 8. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* sobre a ativação de células peritoneais. O índice de espalhamento (A), a produção espontânea de H₂O₂ (B) e a produção espontânea de NO (C) pelas células peritoneais foram avaliados. Os resultados foram expressos com média ± S.E.M de 10 animais/grupo. * p≤0,05 em relação ao Sham; ** p≤0,05 em relação ao Sham, e ao Controle; *** p≤0,05 em relação ao Sham, Controle e EBH .

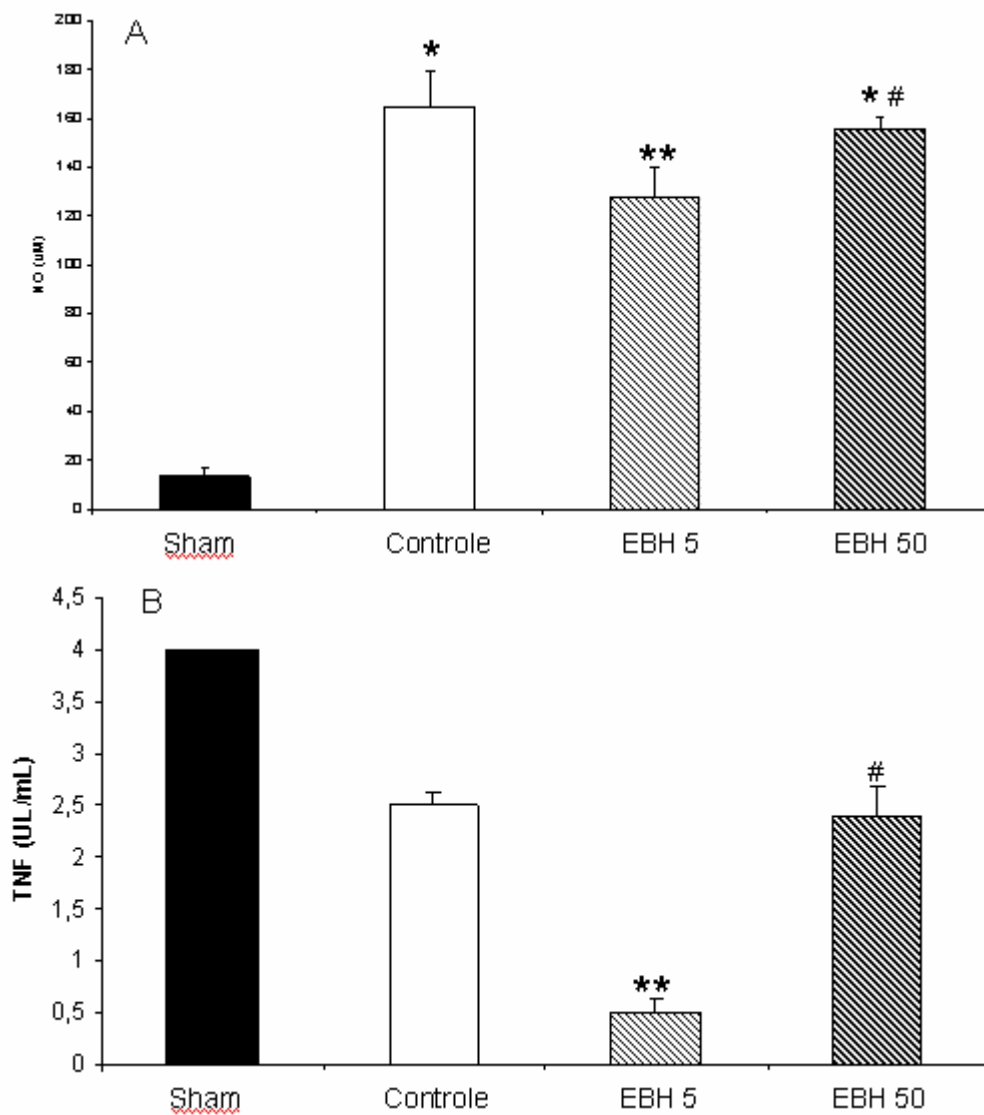


Figura 9. Efeito do tratamento com EBH de *S. jambolanum* sobre a produção de *TNF-α* (A) e nitritos (B) no soro. Os resultados foram expressos como média ± S.E.M de 10 animais/grupo. ** $p \leq 0,05$ em relação ao Sham, e ao Controle; # $p \leq 0,05$ em relação EBH 5.

Discussão

O recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso é essencial no controle de infecções bacterianas. Recentemente, foi demonstrado que na sepse letal induzida por CLP ou por inoculação de *S. aureus* e também na sepse humana, a migração neutrofílica é prejudicada e a falha na migração neutrofílica está associada com a disseminação bacteriana, podendo levar o indivíduo ao óbito (Benjamim et al., 2000; 2002; Crosara-Alberto et al., 2002; Alves-Filho et al., 2005). A espécie vegetal *S. jambolanum* é largamente empregada pela população como antimicrobiana e antifúngica. Estas atividades têm sido comprovadas em modelos *in vitro*, o que nos motivou a avaliar o efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *S. jambolanum* em animais submetidos à CLP.

Os animais foram tratados com EBH das folhas de *S. jambolanum* em diferentes tempos, por via subcutânea. Essa via é uma das mais utilizadas na administração de medicamentos, por ser pouco agressiva, pouco dolorosa e por permitir a absorção do tratamento de forma lenta e contínua (Goodman; Gilman, 1996; Buera et al., 1998).

O tratamento com EBH logo após a CLP induziu a morte de 100% dos animais submetidos a indução de sepse letal. Esse resultado pode ser decorrente do fato termos gerado ao mesmo tempo, dois focos inflamatórios no animal: um no local de tratamento com EBH, e outro no peritônio pela CLP. Isto pode ter gerado uma inflamação sistêmica o que agravou o quadro de sepse nesses animais. Quando o EBH foi oferecido 6h após a CLP, a sobrevivência foi similar ao Controle. Entretanto, o tratamento com EBH 6 horas antes manteve 100% dos animais vivos. Ou seja, o EBH apresentou efeito profilático, mas não terapêutico para o tratamento da sepse letal, induzido por CLP.

O extrato aplicado 6h antes da CLP induziu migração e ativação celular (Figuras 6 e 8), provavelmente por exercer ação pró-inflamatória, antes que o quadro de sepse estivesse instalado. Estes resultados discordam de Chaudhuri et al., (1990); Muruganandan et al., (2001) que demonstraram ação anti-inflamatória da espécie *S. jambolanum*.

É atribuído o efeito hipoglicemiante ao extrato *S. jambolanum* (Prince et al., 1998; Teixeira et al., 2000; Soares et al., 2000; Grover et al., 2000). Por isso, injetou-se EBH das folhas de *Syzygium jambolanum* nos animais sem sepse, a fim de avaliar se o extrato seria capaz de induzir hipoglicemia nos animais, contribuindo para a instalação de um quadro de sepse grave. Após 6h da injeção, a concentração de glicose foi mensurada. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos, portanto nossos resultados foram diferentes dos descritos por Prince et al., (1998); Teixeira et al., (2000); Soares et al., (2000); Grover et al., (2000), sugerindo assim que o EBH das folhas de *S. jambolanum* só é capaz de diminuir a taxa glicêmica em tempos maiores de tratamento do que o utilizado em nossos ensaios.

Com a progressão do quadro endotoxêmico, ocorre a vasodilatação periférica e queda da pressão arterial, com conseqüente redução da perfusão sanguínea tecidual e da glicemia, contribuindo para piora clínica progressiva, resultando na fase hipodinâmica do choque, considerada a fase final da doença (Breitschwerdt et al., 1981; Lang; Dobrescu, 1991; Maitra et al., 2000). Com base nessas considerações, investigamos se o quadro de sepse instalado nos animais seria capaz de induzir hipoglicemia. Sendo assim, induziu-se sepse nos animais que foram tratados 6h antes da ligadura e perfuração cecal. Foi possível observar uma significativa redução na concentração de glicose nos grupos Controle, EBH 5 e EBH 50 em comparação com o grupo Sham, no qual se induziu apenas ligadura cecal, ou seja, a glicemia reduziu quando foi induzida a sepse no animal,

deixando claro que o EBH das folhas de *S. jambolanum* não foi o fator indutor da hipoglicemia. A redução da glicemia em animais nos quais foi feita a CLP pode ser explicada pelo fato das citocinas, mediadores lipídicos (prostaglandinas, PAF e leucotrienos) e os componentes plasmáticos (fatores de coagulação e componentes do sistema complemento), participarem do desenvolvimento da sepse. Estes produtos podem induzir a migração e ativação celular, vasodilatação, agregação plaquetária e aumento da permeabilidade vascular (Benjamim, 2001), podendo resultar na diminuição da concentração sanguínea de glicose.

Na sepse há redução da perfusão sanguínea para os tecidos que resulta em coagulação intravascular disseminada, desencadeada pela ação conjunta da cascata protéica da coagulação e ativação plaquetária. Como consequência ocorre geração e deposição de fibrina e formação de trombos microvasculares em vários órgãos, o que pode levar a falência múltipla dos órgãos (Cohen, 2002; Lolis; Bucala, 2003). Com a formação extensa de coágulos na evolução do quadro séptico, a quantidade de plaquetas circulantes tendem a diminuir, pois ao se ativarem podem se ligar às redes de fibrina (Levi; Ten Cate, 1999; Lolis; Bucala, 2003). O grupo EBH 50 apresentou diminuição do número de plaquetas circulantes (Figura 3), o que deveria ter agravado o quadro de sepse, posto que essa redução poderia ser decorrente da formação de coágulos nos tecidos indicando um quadro de sepse grave. Entretanto, os animais desse grupo, mantiveram 100% de sobrevivência até o quinto dia, indicando que a redução pode ser decorrente da não ativação das plaquetas. Essa hipótese é reforçada pelo aumento da produção de NO uma vez que este metabólito reduz a agregação plaquetária, bem como adesão e ativação de plaquetas (Radomski et al., 1987; Calver et al, 1993; Davies et al., 1995). Com isto, é possível supor que no grupo tratado com a maior dose de EBH as plaquetas estão inativadas, incapazes de formar coágulo. Consequentemente, não

havendo coagulação intravascular sistêmica, os animais mantiveram-se estáveis e vivos até o final do experimento (Figura 1C).

A medula é um órgão linfóide primário onde ocorre a hematopoiese. O fato do tratamento com EBH ter diminuído o número de células na medula óssea, pode ter duas explicações: as células podem ter migrado para o foco infeccioso de forma mais intensa não havendo tempo de ocorrer reposição na medula, ou então pode ser que o tratamento com EBH tenha inibido os precursores de plaquetas, já que estas células estavam em menor número no sangue. A primeira hipótese é a mais provável.

O número total de células da cavidade peritoneal (Figura 6) dos animais nos submetidos à CLP foi maior que no grupo Sham, pois a CLP induz, por si só, migração celular resultando numa peritonite. Além disso, o grupo EBH 5 apresentou um maior número de células totais que os grupos Sham e Controle, o que confirma a hipótese de que o EBH possui um efeito pró-inflamatório.

Na sepse letal ocorre falha na migração neutrofílica, em septicemia induzida por endotoxina de *E.coli*, *S. aureus* ou por CLP, um modelos com predominância de bactérias gram-negativas (Baker et al., 1983; Rocha; Ferreira, 1986; Tavares-Murta et al., 1998; Benjamim et al., 2000; Crosara-Alberto et al., 2002; Alves-Filho et al., 2005). A falha da migração neutrofílica deve-se a ação conjunta da liberação exarcebada de quimiocinas/citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico derivado do iNOS (Crosara-Alberto et al., 2002; Benjamim et al., 2000; 2002). Entretanto, neste trabalho, os camundongos tratados com EBH das folhas de *S. jambolanum* 6h antes da CLP, apresentaram maior número de neutrófilos do que os grupos Sham e Controle. O EBH foi capaz de potencializar a migração neutrofílica para a cavidade peritoneal, aumentando a sobrevivência dos animais. Os animais do grupo Controle apresentaram uma redução na migração neutrofílica e produziram menos peróxido de hidrogênio do que os

animais tratados, o que pode ter levado a uma maior proliferação bacteriana, induzindo sepse letal neste grupo, diferentemente do que ocorreu nos animais tratados com EBH. É possível que o extrato além de aumentar a migração neutrofílica para o foco infeccioso, também tenha diminuído o número de colônias bacterianas pelo aumento na produção de peróxido de hidrogênio. Ma et al. (2006) obtiveram um resultado semelhante quando trataram camundongos nos quais induziu-se CLP, com Liu-Shen-Wan, uma planta medicinal chinesa.

Avaliando-se o processo de ativação celular peritoneal induzida pelo tratamento com EBH, constatou-se que os animais dos grupos EBH 5 e 50 produziram mais peróxido de hidrogênio espontaneamente do que os grupos Sham e Controle. O espraçamento celular também foi significativamente maior nos animais tratados com EBH em comparação ao Sham; além disso, o grupo EBH 50 apresentou maior índice de espraçamento do que os grupos Sham, Controle e EBH 5. A capacidade de espraçamento e a liberação de peróxido de hidrogênio, estão relacionados a uma resposta inflamatória e conseqüente ativação celular (Cruz et al., *in press*), deixando evidente que o EBH pode apresentar atividade pró-inflamatória, induzindo assim a ativação celular, especificamente de neutrófilos.

O aumento na produção de NO, visto nos grupos EBH 5 e 50, foi suficiente para manter o tônus vascular periférico (Rees et al., 1989). Segundo Wolkow, (1998); Benjamim et al., (2001), quando a produção de NO é exacerbada, um quadro de hipotensão poderia se instalar num animal com sepse induzindo a um choque séptico, pois o NO induz relaxamento do músculo vascular liso, o que levaria à queda da pressão arterial e além disso poderia diminuir a aderência dos leucócitos às células endoteliais.

O nitrito sérico aumentou nos grupos tratados com extrato em relação ao Sham, assemelhando-se ao resultado NO de obtido em sobrenadantes de células da cavidade peritoneal (Figura 9A).

Alguns trabalhos descritos na literatura utilizando o modelo CLP, mostram a dosagem de TNF- α , diferentes períodos de tempo, citocina é liberada num processo inflamatório em resposta a um processo infeccioso. Benjamim et al. (2000) demonstraram que o nível de TNF- α no soro foi elevado 4h e 24h após a sepse letal.

Maier et al., (2004) após dosarem o TNF- α em diferentes tempos (6h, 12h e 24h) após a CLP demonstraram que houve produção de TNF- α em todos os tempos avaliados. O mesmo foi observado por Iseri et al., (2005), que dosaram TNF- α após 24h. Baseado nesses trabalhos foi feita aqui a avaliação do TNF sérico 12 h após a CLP. Entretanto, neste trabalho a concentração de TNF foi baixa em todos os grupos e o grupo EBH 5 foi o único que diminuiu em relação aos outros grupos (Figura 9B).

O tratamento de pacientes com sepse, até hoje é feito por meio de antibióticos e drogas que interferem nas alterações cardiovasculares mas não na inflamação desencadeada pelos patógenos, desequilibrando assim a homeostase do organismo. Esses medicamentos causam efeitos colaterais graves e resistência a cepas bacterianas. Além disso, esses medicamentos atuam diretamente nas bactérias e não são capazes de induzir uma resposta imunológica sincronizada. Os resultados obtidos aqui mostram que o tratamento dos animais com EBH reverteu o quadro de sepse letal. Este efeito foi devido, provavelmente, a atuação pró-inflamatória do *S. jambolanum*. Dessa forma, sugerimos o extrato dessa planta pode ser administrado de modo profilático em infecções bacterianas, o que poderia justificar o seu uso popular no tratamento de doenças infecciosas.

5. Conclusões

- O tratamento com EBH das folhas de *Syzygium jambolanum* atuou de modo profilático na sepse letal.
- Houve um aumento na migração neutrofílica para a cavidade peritoneal nos camundongos tratados com EBH.
- O tratamento com EBH induziu uma diminuição do número de plaquetas e de células na medula óssea, mas não alterou o número de células do (baço e linfonodo), dos animais tratados com EBH.
- O tratamento com EBH não alterou o peso dos órgãos linfóides (linfonodo e baço), mas alterou o peso do fígado.
- O tratamento com EBH não alterou a concentração de nitrito sérico em relação ao Controle.
- O tratamento com EBH 5 mg/kg diminuiu o TNF sérico.
- O EBH apresentou efeito pró-inflamatório, pois induziu aumento no número de neutrófilos e na concentração de H₂O₂.

Referências Bibliográficas

- Altamura, M., Caradonna, L., Amati, L., Pellegrino, N.M., Urgesi, G., Miniello, S., 2001. Splenectomy and sepsis: The role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 23, 153-161.
- Alves-Filho, J.C., Benjamim, C., Tavares-Murta, B.M., Cunha, F.Q., 2005. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 100, 223-226.
- Babior, B. M., 1984. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73, 599-601.
- Babior, B. M., 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 93, 1464-1476.
- Baker, C.C., Chaudry, I.H., Gaines, H.O., Baue, A.E., 1983. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine caecal ligation and puncture model. *Surgery.* 94, 331-335.
- Beckman, J., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87, 1620-1624.
- Benjamim, C.F., Silva J.S., Fortes, Z.B., Oliveira, M.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2002. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect. Immun.* 70, 3602-3610.
- Benjamim, C.F., 2001. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Med. Ribeirão Preto.* 34, 18-26.
- Benjamim, C.F., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Role of oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infec. Dis.* 182, 214-223.

- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelter, W., Manogue, K.R., Cerami, A., Bucala R., 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 365, 756-759.
- Bohnsack, J. F.; Brown, E. J., 1986. The role of the spleen in resistance to infection. *Annu. Rev. Med.*. 37, 49-59.
- Bone, R. C., 1991. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.*, 115:457-469.
- Breitschwerdt, E.B., Loar, A. S., Hribernik, T. N. Mc Grath R.K., 1981. Hypoglycemia in four dogs with sepsis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 178, 1072-1076.
- Brito, F.A., Lima, L.A., Ramos, M.F.S., Nakamura, M.J., Cavalher-Machado, A.C. Siani, M.G., Henriques, M.G.M.O., Sampaio, A.L.F., 2007. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Anti-allergic activity of *Syzygium cumini* *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, 105-115.
- Buera, E., Breneis, C., Michaude, M., Bacovsky, R., Emeno, A., MacDonald, N., 1998. Use of the subcutaneous route for the administration of narcotics in patients with cancer pain. *Cancer*. 62,407-411.
- Calandra, T., Cohen, J., 2005. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med.*33,1538-48.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, Le D., Pugin, J., Metz, C.N., Hültner, L., Heumann, D., Männel, D., Bucala, R., Glauser, M.P., 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature America Inc.* 6, 64-170.

- Calandra, T., Froidevaux, C., Martin, C., Roger, T., 2003. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune defenses against bacterial sepsis. *J. Inf. Dis.* 187,385–390.
- Calver, A., Collier, J., Vallance, P., 1993. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp. Physiol.* 78, 303-326.
- Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., 2004. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seed. *J. Ethnopharmacol.* 91,105-108.
- Chattopadhyay, D., Sinha B. K., Vaid L. K., 1998. Antibacterial activity of *Syzygium* species. *Fitoterapia.* 69, 365 – 367.
- Chaudhuri, A.K.N., Pal, S., Gomes, A., Bhattacharya, S. 1990. Anti – inflammatory and related actions of *Syzygium cuminii* seed extract. *Phytother. Res.*, 4: 5 – 10.
- Cohen J., 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 420, 885-891.
- Crosara-Alberto, D. P., Darini, A. L., Inoue, R. Y., Silva, J. S., Ferreira, S. H., Cunha, F.Q., 2002. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Pharmacol.* 136, 645–658.
- Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Patrício, F.J., Costa, G.C., Sousa, S.M., Frazão, J.B., Aragão-Filho, W.C., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Amaral, F.M.M., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M., Nascimento, F.R.F., Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxid production induced by hidroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *J. Ethnopharmacol.*, in press.
- Davies, M. G., Fulton, G. J., Hagen, P.O., 1995. Clinical biology of nitric oxide. *Br. J. Surg.* 82, 1598-1610.
- Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J., 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison

- of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141, 2407–2412.
- Docke, W.D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Wolk, D.H., Kox, W., 1997. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med.* 3, 678-681.
- Flick, D.A., Gifford, G.E., 1984. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Meth.* 68, 167-175.
- Garcia, C.G., Pólo, A. S., Iha N. Y. M., 2003. Photoelectrochemical solar cell using extract of *Eugenia jambolana* Lam as a natural sensitizer. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 75, 163-165.
- Goodman, L.S., Gilman, A.G., 1996. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Grover, J. K., Vates, V., Rathi, S. S., 2000. Anti hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *J. Ethnopharmacol.* 73, 461-470.
- Hickey, M. J., Kubes, P., 1997. Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions. *Exp Physiol.* 82, 339-348.
- Hickey, M.J., 2001. Role of inducible nitric oxid synthase in the regulation of leukocyte recruitment. *Clin. Sci.* 100, 1-12.
- Hickey, M.J., Sharkey, K.A., Sihota, E.G., Reinhardt, P.H., Macmicking, J.D., Nathan, C., Kubes, P., 1997. Inducible nitric oxid synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interations in endotoxemia. *Faseb J.* 11, 955-964.
- Hotchkiss, R.S., Karl, I.E., 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 348,138-150.

- Hyde, S.R., Stith R.D., McCallum R. E., 1990. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *J. Surg. Res.* 58, 619-624.
- Iazetti, P. E., Mantovani, M., 1998. Hiperoxia hiperbárica em infecções graves e sepse-conceitos e perspectivas. *Med. Ribeirão Preto.* 31, 412-423.
- Iseri, S., O., Sener, G., Saglam, B., Gedik, N., Ercan, F., Yegen, B., 2005. Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. *J. Surg. Res.* 126, 73-81.
- Kusumoto, I.T., Nakabayashi, T., Kida, H., Miyashiro, H., Hattori, M., Namba, T. & Shimotohno, K., 1995. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. *Phytother. Res.* 9, 180-184.
- Lang, C. H., Dobrescu, C., 1991. Sepsis-induced increases in glucose uptake by macrophage-rich tissues persist during hypoglycemia. *Metabolism.* 40, 585-593.
- Levi, M, Ten Cate, H. Disseminated intravascular coagulation., 1999. *N. Engl. J. Med.* 341, 586-592.
- Loguercio, A. P., Battistin, A., Vargas, A. C.; Henzel, A., Witt, N. M., 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Cienc. Rural.* 35, 371-376.
- Lolis E., Bucala R., 2003. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nature.* 2, 635-644.
- Ma, H., Kou, J., Zhu, D., Yan, Y., Yu, B. 2006. Liu-Shen-Wan, a traditional Chinese medicine, improves survival in sepsis induced by cecal ligation and puncture via reducing TNF- α levels, MDA content and enhancing macrophage phagocytosis. *Int. Immunopharmacol.* 6,1355-1362.

- Maier, S., Traeger, T., Entleutner, M., Westerholt, A., Keist, B., Huser, N., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K., Heidecke, C.D., 2004. Cecal ligation and puncture versus colun ascendentes stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*.21, 5-511.
- Maitra, S. R., Wojnar, M. M., Lang C. H., 2000. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. *Shock*. 13, 379-385.
- Mazzanti, C. M., Schossler, D. R., Fillapi, A., Prestes, D., Balz D., Miron, V., Morsch A., Schetinger, M. R. C., Morch, V. M., Cecim, M., 2003. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. *Ciênc. Rural Santa Maria*. 33, 1061-1065.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biol. Chem*. 5, 62-71.
- Muruganandan, S., Srinivasan, K., Chandra, S., Tandan, S. K., Lal, J., Raviprakash., 2001. Anti-inflamatóry activity of *Syzygium cumini* bark. *Fitot*. 72, 369-375.
- Nascimento, F.R.F., Rodrigues, D., Gomes, E., Fernvik, E. C., Russo, M., 2003. A method for multiple sequential analyses of macrophage function using a smalla single cell sample. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 26, 1221-1226.
- Nascimento, G. G. F., Locatelli J., Freitas P. C., Silva G. L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol*. 31, 247-256.
- Oeckler , R. A., Wolin, M.S., 2000. New concepts in vascular nitric oxide signaling. *Curr Atheroscler Rep*. 2, 437-44.
- Paes, N. A., 2004. A mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias na população idosa brasileira. *Rev Panam Salud Publica*. 4, 233-41.

- Pick, E., Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* 38, 161-170.
- Pick, E., Mizel, D., 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods.* 46, 211-226.
- Prince, P.S.M., Menon, V.P., Pari, L., 1998. Hypoglycaemic activity of *Syzygium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 61, 1-7.
- Rabinovitch, M., Manejias, R.E., Russo, M., Abbey, E.E., 1977. Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers. *Cell. Immunol.* 29, 86-95.
- Randomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S., 1987. Endogenous NO inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1057-1058.
- Rees, D.D., Palmer, R.M., Hodson, H.F., Moncada, S., 1989. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxations. *Br J Pharmacol.* 96, 418-24.
- Ribeiro, R. M., 2007. Estudo da atividade hipotensora das folhas de *Syzygium jambolanum* D.C. (jambolão). Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão.
- Riedmann N.C., Guo R.F., Laudes I.J., Keller K., Sarma V.J., Pagdgaonkar V., Ward P. A., 2002. C5a receptor and thymocyte apoptosis in sepsis. *Faseb J.* 16, 887-01.
- Riedmann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A., 2003. The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.* 112, 460-467.
- Rios-Santos, F., Benjamim, C. F., Zavery, D., Ferreira, S. H., Cunha F. Q., 2003. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. *Shock.* 19, 61-65.

- Rocha N.P., Ferreira, S. H., 1986. Restoration by levamisole of endotoxin-inhibition neutrophil migration, oedema and increase permeability induced by carrageenin.. Eur. J. Pharmacol. 122, 87-92.
- Romero, M.J., 1995. Acción cardiovascular de extractos acuosos de hojas de *Syzygium jambos* (L.). Alston. Revista Costarricense de Ciências Médicas. 16, 17-25.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochem. 30, 3875-3883.
- Schossler, D. R., Mazzanti, C. M., Luz, S. C. A., Filappi, A., Prestes D., A. F. Silveira, Cecim M., 2004. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini*. Ciência Rural, Santa Maria. 34, 1821-1825.
- Segal, A. W., 2005. How neutrophils kill microbes. Annu Rev Immunol., 23: 197-223.
- Shafi, P.M., Rosamma M. K., Jamil K., Reddy P. S., 2002. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancorium* leaf essential oils. Fitoterapia. 73, 414-416.
- Soares, J. C. M., Costa, S. T., Cecim, M. 2000. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com diabetes mellitus aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. Ciência Rural. 30, 113-118.
- Tavares-Murta, B. M., Machado, J. S., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., 2001. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. Inflammation. 25, 247-253.
- Tavares-Murta, B. M., Zaparoli, M., Ferreira, R. B., Silva-Vergara, M. L., Oliveira, C. H., Murta, E. F., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., 2002. Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. Crit. Care Med. 30,1056-1061.
- Tavares-Murta, B.M., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1998. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil

chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1369–1374.

Texeira, C.C., Rava C. A., Silva P. M., Melchior R., Argenta R., Anselmi F., Almeida C.R., Fuchs F.D., 2000. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. *J. Ethnopharmacol.* 71, 343-347.

Vermani K., Garg S., 2002. Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *J. Ethnopharmacol.* 80, 49-66.

Wichtermann, K. A., Baue, A.E., Chaudry, I.H., 1980. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 29,189-201.

Wolkow, P.P., 1998. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm. Res.* 47, 152-166.

Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J.M., Yang, D., Gong, W. H., Yoshimura, T., 2001. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J. Leuk. Biol.* 69, 1-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)