

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Paula Mariana Munno Guimarães Corrêa

**TOXICIDADE AGUDA E EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DAS
FOLHAS DE *Miconia ferruginata* DC. EM MODELO EXPERIMENTAL DA
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

DIAMANTINA, MG

2020

Paula Mariana Munno Guimarães Corrêa

**TOXICIDADE AGUDA E EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO
DAS FOLHAS DE *Miconia ferruginata* DC. EM MODELO EXPERIMENTAL DA
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander Dias Machado

DIAMANTINA, MG

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M966t Munno, Paula Mariana Munno Guimarães Corrêa.
Toxicidade aguda e efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de
Miconia ferruginata DC. em modelo experimental da Distrofia
Muscular de Duchenne / Paula Mariana Munno Guimarães Corrêa
Munno, 2020.
93 p.: il.

Orientador: Alex Sander Dias Machado

Dissertação (Mestrado – Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
Mucuri, Diamantina, 2020.

1. MDX. 2. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). 3. Screening
hipocrático. 4. *Miconia ferruginata*. 5. Anti-inflamatório. 6. Fibrose. 7.
Regeneração. I. Machado, Alex Sander Dias. II. Título. III.
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615.8

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa – CRB6/2972



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PAULA MARIANA MUNNO GUIMARÃES CORREA

TOXICIDADE AGUDA E EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *MICONIA FERRUGINATA* DC. EM MODELO EXPERIMENTAL DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação **Multicêntrico em Ciências Fisiológicas** da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, **nível de Mestrado**, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Ciências Fisiológicas**.

Orientador: **Prof. Alex Sander Dias Machado**

Data de aprovação 07/08/2020.

PROF.DR. MARCO FABRICIO DIAS PEIXOTO - UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PROF.DR. EDUARDO DE JESUS OLIVEIRA - UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PROFa. DR.ª THAIS PEIXOTO GAIAD MACHADO - UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PROF. DR ALEX SANDER DIAS MACHADO- UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo de Jesus Oliveira, Servidor**, em 17/12/2020, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais Peixoto Gaiad Machado, Servidor**, em 17/12/2020, às 17:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Fabricio Dias Peixoto, Servidor**, em 17/12/2020, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alex Sander Dias Machado, Servidor**, em 18/12/2020, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0246299** e o código CRC **D9914CA7**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela paciência e discernimento nos momentos mais confusos, pela glória e crescimento nos momentos de conquista.

Ao meu orientador, Alex Sander Dias Machado, obrigada por todos os ensinamentos, puxões de orelha e trocas de experiências docentes. Por ser um exemplo de pessoa, sempre disposta e do coração de ouro e um excelente profissional, por acreditar e confiar em mim nos momentos mais difíceis e por reconhecer todas as conquistas. Um PAI, que encontrei nessa jornada! Levarei com toda gratidão por toda a minha vida!

Aos meus pais, Flávia Maria França Munno e Valmir José Guimarães, obrigado por todos os ensinamentos, os quais me fizeram chegar até aqui, pelo amor incondicional e por me apoiarem em todas minhas escolhas.

Ao Meu filho amado Caio Munno Guimarães Corrêa, obrigado por cada carinho, por cada abraço, pela força que me inspirava a cada manhã, mesmo no dia de domingo, mamãe acorda vai fazer seu artigo. Por você lutarei por toda a minha vida, Te Amo incondicionalmente!

Ao meu marido Isaías de Souza Corrêa, meu único amor, agradeço pelo companheirismo e compreensão, por estar comigo em cada fase desse processo, segurando minha mão e cuidando de mim, acreditando no meu sonho tanto quanto eu.

A Avó Antonia do Rosário, e meu falecido Avô Braulio Guimarães, amo vocês! Minha irmã Marcela Munno Guimarães, sempre longe, mas sempre presente em meu coração.

A minha Tia Carminha França, Tia Lu, Tio Bim, amarei vocês de Janeiro a Janeiro! Aos meus primos Tucho, a minha prima Carioca Cristiane França e Patrícia Guimaraes, vocês foram luz na minha caminhada!

Aos meus amigos da turma do mestrado, pelo crescimento pessoal e profissional, por compartilhar experiências e sonhos, por me respeitarem e por contribuírem com esse trabalho.

À minha Prof^a. Thaís Peixoto Gaiad, obrigada por todos os ensinamentos com tanta leveza e aos mestres desse período, por serem pessoas de luz e fonte de inspiração.

A minhas primas, agradeço de todo o meu coração por acreditarem em mim e ter conseguido me ajudar Cristiane França, Patrícia Guimaraes, Caroline Peixoto.

As minhas amigas, Poliana Barroso, Fabiana Trivellato e Alcilene Gomes por serem inspiração e exemplo de coragem. Aos meus amigos ou irmãos de laboratório Heloisa, Letícia de Melo Vitorino, Thiago Marques Salgueiro, vocês me ensinaram e me guiaram quando precisei, acreditando sempre em mim e muito nesse trabalho, guardarei com muito amor e jamais esquecerei de vocês. Pedro Pinto Godoy e Bernardo Barbosa pelas experiências de campo, agradeço imensamente.

Às minhas alunas de IC Bruna Vasconcellos Fonseca “braço direito” e Geovane, Ana Luiza e a Rafaela Crisley agradeço por toda dedicação durante as coletas, pelo empenho para que tudo desse sempre certo e por acreditar nessa conquista.

Aos companheiros de Laboratório Richelle, Andrea lemes Morais, agradeço pelas contribuições.

Aos técnicos de laboratório, Natália de Tartller (NEA) e Vinicius Ottone e Vinicius Cantuária (FAMED), pelas orientações, ensinamentos e experiências.

A todos que viveram e acreditaram nesse sonho, hoje ele se torna realidade!

A Universidade e os seus docentes que fizeram parte do meu ensino. Gratidão!

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

'A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original'.

(Albert Einstein).

RESUMO

A distrofia Muscular de Duchenne é o tipo mais comum e mais grave das distrofias musculares, relacionada à alteração genética e ausência da proteína distrofina, que promove um efeito progressivo e rápido na degeneração muscular. Os corticosteroides são os fármacos mais utilizados no tratamento dessa patologia, se mostrando eficientes na redução da sua progressão, porém são apontados vários efeitos adversos associados a essa terapêutica. Assim, terapias com menor toxicidade, especialmente derivadas de plantas medicinais, têm sido testadas para promover melhora do quadro clínico e da qualidade de vida dos pacientes. Devido ao potencial antioxidante e anti-inflamatório da espécie *Miconia ferruginata* demonstrado em testes *in vitro*, o objetivo desta pesquisa foi avaliar, *in vivo*, a toxicidade aguda e os efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*, em modelo animal da distrofia de Duchenne. Para isso, os camundongos *mdx* foram tratados por via intraperitoneal com as doses de 50, 100, 200, 300 e 2000 mg/kg do extrato aquoso da planta, segundo protocolo de toxicidade aguda em dose única, e mantidos em observação por 14 dias. Por meio do *screening* hipocrático e avaliação de consumo de água, alimento e peso corporal foram determinados fatores associados à faixa de toxicidade do extrato e cálculo da dose letal de 50% (DL₅₀). Além disso, foram avaliados parâmetros morfológicos (macro e microscópicos), presença de infiltrado inflamatório, quantificação de fibrose e análises imuno-histoquímicas para os tecidos do fígado, pulmão e músculo tibial anterior. Os resultados obtidos mostraram que para a dose de 2000 mg/kg houve elevada toxicidade com comprometimento respiratório, neurotoxicidade, alterações histopatológicas e morfológicas consideráveis nos tecidos avaliados. Além disso, nesta dose houve letalidade de 100% no período de até 48 horas. Já para as outras doses avaliadas (300, 200, 100 e 50 mg/kg), os animais não apresentaram alterações comportamentais e nem houve sinais de toxicidade. Com a administração do extrato aquoso houve uma redução dose-dependente das alterações histopatológicas e morfológicas, bem como redução da fibrose, inflamação tecidual, de marcadores de estresse celular (HSP70) e aumento de marcadores antiapoptóticos (MCL-1). De forma geral, a dose de 50 mg/kg mostrou ter um elevado potencial regenerativo tecidual e anti-inflamatório, visto que nesta dose, para todos os tecidos avaliados, houve reversão da fibrose e redução drástica da inflamação local.

Palavras chave: MDX, Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), *screening* hipocrático, *Miconia ferruginata*, anti-inflamatório, fibrose, regeneração.

ABSTRACT

Duchenne Muscular dystrophy is the most common and severe type of muscular dystrophy, related to genetic alteration and absence of dystrophin protein, which promotes a progressive and rapid effect on muscle degeneration. Corticosteroids are the most used drugs in the treatment of this pathology, proving to be efficient in reducing its progression, however several adverse effects associated with this therapy are pointed out. Thus, therapies with less toxicity, especially those derived from medicinal plants, have been tested to improve the clinical condition and quality of life of patients. Due to the antioxidant and anti-inflammatory potential of the *Miconia ferruginata* species demonstrated *in vitro* tests, the aim of this research was to evaluate, *in vivo*, the acute toxicity and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of the leaves of *M. ferruginata*, in an animal model of Duchenne dystrophy. For this, the mdx mice were treated intraperitoneally with doses of 50, 100, 200, 300 and 2000 mg/kg of aqueous plant extract, according to a single dose acute toxicity protocol, and kept under observation for 14 days. Through hypocratic screening and assessment of water, food and body weight consumption, factors associated with the toxicity range of the extract and calculation of the 50% lethal dose (LD₅₀) were determined. In addition, morphological parameters (macro and microscopic), presence of inflammatory infiltrate, fibrosis quantification and immunohistochemical analyzes for the tissues of the liver, lung and anterior tibial muscle were evaluated. The results obtained showed that for the 2000 mg/kg dose there was high toxicity with respiratory impairment, neurotoxicity, considerable histopathological and morphological changes in the evaluated tissues. In addition, in this dose there was 100% lethality in the period up to 48 hours. For the other doses evaluated (300, 200, 100 and 50 mg / kg), the animals showed no behavioral changes and there were no signs of toxicity. With the administration of the aqueous extract there was a dose-dependent reduction in histopathological and morphological changes, as well as a reduction in fibrosis, tissue inflammation, cell stress markers (HSP70) and an increase in anti-apoptotic markers (MCL-1). In general, the dose of 50 mg/kg showed a high tissue regenerative and anti-inflammatory potential, since in this dose, for all evaluated tissues, there was reversal of fibrosis and a drastic reduction of local inflammation.

Keywords: MDX; Duchenne Muscular Dystrophy (DMD); hypocratic *screening*; *Miconia ferruginata*, anti-inflammatory, fibrosis, regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Conceito em vigor da organização molecular do complexo distroglicana no sarcolema extrajuncional. 21
- Figura 2 – Fotografia das folhas de *Miconia ferruginata*. 33
- Figura 3 – Metodologia do ensaio de toxicidade aguda dose única, a partir da dose de 2000 mg/kg em animais de laboratório. 31
- Figura 4 – *Screening* hipocrático da avaliação comportamental dos animais submetidos ao tratamento em dose única do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 43
- Figura 5 – Avaliação do desenvolvimento ponderal dos animais tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 44
- Figura 6 – Avaliação do consumo de água e ração dos animais tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 45
- Figura 7 – Análise macroscópica do fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 47
- Figura 8 – Análise histológica do fígado dos camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 49
- Figura 9 – Análise histológica do pulmão dos camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 51
- Figura 10 – Análise histológica do músculo tibial anterior dos camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 53
- Figura 11- Análise da distribuição das fibras colágenas no músculo tibial anterior de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 55

Figura 12- Análise da distribuição das fibras colágenas no fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 57
Coloração por *Picrossilius red* (400X).

Figura 13- Análise da distribuição das fibras colágenas no pulmão de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 58

Figura 14 – Quantificação percentual da área de fibrose em diferentes órgãos dos camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 60

Figura 15 - Análise imuno-histoquímica anti-HSP70 no tecido do fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata* (400X). 62

Figura 16 - Análise imuno-histoquímica anti-HSP70 no tecido do pulmão de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 63

Figura 17 - Análise imuno-histoquímica anti-HSP70 no tecido do músculo tibial direito de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 64

Figura 18 - Análise imuno-histoquímica anti-MCL-1 no tecido do fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos	41
Tabela 2 – Média e desvio padrão do peso dos órgãos dos animais tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de <i>Miconia ferruginata</i> .	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Perfil químico e atividades biológicas de espécies do gênero *Miconia* sp. 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variancia
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
<i>Bim</i>	Bcl-2 interacting mediator of cell death
CA	Califórnia
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DAB	Cromógeno 3,3 -diaminobenzidina
DL ₅₀	Dose letal média ou de 50%
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
EUA	Estados Unidos
GHS	Global Harmonized System
HDJF	Herbário Dendrológico Jeanine Felfili
HSP40	Proteínas de choque térmico de 40 kilodaltons
HSP70	Proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons
HE	Hematoxilina e eosina
Ip	Intraperitoneal
MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MD	Maryland
MG	Minas Gerais
MO	Missouri
NEA/FCBS	Núcleo de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
RJ	Rio de Janeiro
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
UFVJM	Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS

°C	Graus celsius
G	Gramas
M	Molar
mg/kg	Microgramas por kilograma
mL	Militros
mM	Milimolar
p/v	Peso por volume
μm	Micrômetros
%	Porcentagem
®	Marca registrada
μ	Micro
α	Alfa
β	Beta
≤	Menor ou igual que
≥	Maior ou igual que
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	18
2.2 Modelo experimental de Distrofia muscular de Duchenne	21
2.3 Proteínas marcadoras de estresse celular e de citoproteção	23
2.4 As Plantas Medicinais Brasileiras	25
2.5 Importancia da avaliação da toxicidade de plantas	26
2.6 Família Melastomataceae e o Gênero <i>Miconia</i> sp.	28
2.7 <i>Miconia ferruginata</i> DC.	31
3 OBJETIVO	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Coleta e identificação taxonômica	35
4.2 Preparo dos extratos	35
4.3 Animais	36
4.4 Grupos experimentais.....	36
4.5 Toxicidade aguda dose única do extrato aquoso da <i>M. ferruginata</i> e determinação da DL ₅₀ 37	
4.5.1 <i>Screening</i> Hipocrático.....	37
4.5.2 Avaliação ponderal e consumo de água e ração	38
4.5.3 Determinação da DL ₅₀	38
4.5.4 Avaliação anatômica-histopatológica	38
4.5.4.1 Análise morfológica.....	39
4.5.4.2 Coloração com <i>Picrossirius Red</i>	39
4.6 Análise Imuno-histoquímica	40
4.6 Análises estatísticas	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Determinação da toxicidade aguda dose única.....	42

5.1.1 Screening Hipocrático.....	42
5.1.2 Avaliação ponderal	44
5.1.4 Determinação da DL₅₀	45
5.1.5 Avaliação morfológica (macroscópica e microscópica)	46
5.1.5.1 Análise macroscópica.....	46
5.1.5.2 Análise microscópica.....	48
5.1.6 Descrição morfológica e quantificação da fibrose pela coloração de <i>Picrosilius red</i>	54
5.7 Avaliação Imuno-histoquímica dos marcadores de estresse e apoptose (HSP70 e MCL-1).....	61
6 DISCUSSÃO.....	66
7 SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	72
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
8 REFERÊNCIAS	73
ANEXO A - PROTOCOLO DE DESIDRATAÇÃO, DIAFANIZAÇÃO E INCLUSÃO DOS TECIDOS	88
ANEXO B - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO – HEMATOXILA/ EOSINA.....	89
ANEXO C - PROTOCOLO DA REAÇÃO DE PICROSSIRIUS RED	90
ANEXO D - PROTOCOLO DA SILANIZAÇÃO DAS LÂMINAS ORGANOSILANO - 3' AMINOPROPYL - TRIETHOXYSILANE	91
ANEXO E - PROTOCOLO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	92

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio genético progressivo com padrão de herança recessiva associada ao cromossomo X, que acomete cerca de um a cada 3.500 nascidos vivos do sexo masculino (McDONALD, 2002; SANTOS *et al.*, 2006; JARRAH *et al.*, 2014). Clinicamente, a DMD é a doença mais severa das distrofias musculares humanas, caracterizada por uma fraqueza muscular de cunho progressivo e irreversível, devido a uma mutação patogênica no gene da proteína distrofina, relacionada ao sistema sarcotubular motor (KUEH *et al.*, 2008; FRAYSSE *et al.*, 2017). Apesar do avanço sobre o conhecimento da doença, ainda não existe um tratamento eficaz, apenas medidas para reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a mobilidade e melhorar a qualidade de vida (NAIR *et al.*, 2001; FREZZA *et al.*, 2005). Dentre os tratamentos farmacológicos existentes estão a classe dos corticosteroides, que parecem reduzir significativamente o avanço da doença e melhora da função pulmonar, porém existem muitos efeitos adversos e a maioria dos pacientes não toleram essa terapia a longo prazo (CAMPBELL & JACOB, 2003; CIAFALONI & MOXLEY, 2008).

Levando-se em conta a complexidade dessa doença, uma das formas de estudo sobre terapias mais eficientes para a DMD, é o uso de modelos animais dos quais o camundongo *mdx* é um dos mais utilizados (SEIXAS *et al.*, 1997; WILLMANN *et al.*, 2009). Os animais da linhagem *mdx* apresentam, tais como os humanos, mutação espontânea no cromossomo X que leva à deficiência da distrofina (BULFIELD *et al.*, 1984; LEFAUCHEUR *et al.*, 1995). E, apesar do modelo apresentar ciclos de regeneração com baixa deposição de tecido adiposo e fibrose muscular branda, promovendo uma distrofia menos severa, os animais apresentam intenso infiltrado inflamatório e ciclos de mionecrose característico da DMD humana (BULFIELD *et al.*, 1984; GROUNDS *et al.*, 2008).

A planta nativa do Cerrado brasileiro, *Miconia ferruginata* DC. (Família: Melastomataceae), popularmente conhecida como pixirica-do-campo ou babatenã, tem sido utilizada popularmente como anti-inflamatório natural para tratar processos alérgicos de pele e outras doenças inflamatórias e infecciosas (ALMEIDA & BANDEIRA, 2010). Tal atividade tem sido avaliada em estudos *in vitro*, por grupo de pesquisa em produtos naturais da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) (BARROSO, 2015; LIMA, 2016; CRUZ, 2017). Segundo estes estudos, os extratos aquosos das folhas e caule apresentaram elevada inibição proliferativa de linfócitos com uma eficácia de 2,5 vezes à do fármaco dexametasona. Além disso, foi verificada elevada capacidade antioxidante e redução

do *burst* respiratório de neutrófilos do extrato das folhas e do caule, reforçando o potencial antioxidante e, provavelmente, anti-inflamatório desta espécie.

Assim, tendo em vista a necessidade da busca de terapias mais eficientes e menos tóxicas para a distrofia de Duchenne, e do potencial anti-inflamatório *in vitro* observado para a espécie, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito terapêutico de diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginta* sobre os parâmetros clínicos, morfológicos, regenerativos e anti-inflamatórios, em modelo animal da distrofia de Duchenne. Além disso, determinar a toxicidade aguda em dose única *in vivo*, deste extrato. Este estudo possibilitará melhor compreensão da ação anti-inflamatória/regenerativa *in vivo*, em modelo de inflamação crônica da distrofia de Duchenne e determinação da dose não-letal para a espécie *M. ferruginta*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

A DMD é um distúrbio genético autossômico recessivo, caracterizado por um comprometimento grave, progressivo e irreversível da musculatura esquelética estriada, cardíaca e respiratória (SANTOS *et al.*, 2006; JARRAH *et al.*, 2014). Esse distúrbio neuromuscular miogênico está associado a mutações do braço curto do cromossomo X, no gene da banda p21, o maior gene do genoma humano (2,4 Mb), localizado na região Xp21.2-Xp21.1, responsável pela transcrição da proteína distrofina (BRASILEIRO FILHO, 2000; GOMES *et al.*, 2011). Devido ao tamanho e complexidade do gene, existe uma elevada frequência de mutação, deleção ou duplicação, sendo a deleção a mutação mais frequente na patologia, com cerca de 65% das alterações (GOMES *et al.*, 2011; ORTEZ *et al.*, 2019). O resultado dessas alterações gênicas é a leitura errada e/ou parada prematura da transcrição e codificação anormal da proteína, a tornando instável e facilmente degradadas por proteases endógenas (SEIXAS *et al.*, 1997).

A primeira observação de alteração com paralisia muscular pseudo-hipertófica foi realizada em 1861 na França, pelo Dr. Duchenne de Boulogne, condição que posteriormente ficou conhecida como DMD. A DMD é a causa mais frequente de distrofia muscular, acometendo um a cada 3.500 nascidos vivos (JARRAH *et al.*, 2014), sendo hereditária em 70% dos casos, enquanto 30% ocorre por mutação espontânea do cromossomo X (BOBO *et al.*, 2009). Embora essa patologia esteja relacionada à herança genética recessiva materna do cromossomo X, ocorrendo exclusivamente no sexo masculino (CIAFALONI & MOXLEY, 2008), algumas mulheres portadoras assintomática da doença, podem apresentar a partir da terceira década de vida, fraqueza muscular, mialgia, aumento dos níveis plasmáticos da enzima creatina-quinase e cardiomiopatia (BOBO *et al.*, 2009; SEEMANN *et al.*, 2011; VENUGOPAL & PAVLAKIS, 2020).

As características fisiopatológicas da DMD é a presença de ciclos de degeneração e regeneração muscular contínuos, desencadeando fibrose extensa e redução progressiva da massa muscular (CARMEN *et al.*, 2019). Isso ocorre porque, a proteína distrofina é uma grande proteína estrutural de 427 kDa localizada na face citoplasmática do sarcolema que se encontra associada a um complexo de glicoproteínas, que interliga os miofilamentos (filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos) e os complexos de proteínas transmembrana, especialmente canais de íons como os canais de cálcio (PRICE *et al.*, 2007; HORITA & CRUZ, 2015) (Figura 1). O complexo distrofina-glicoproteínas desempenha

papel essencial na manutenção da estabilidade mecânica e maior elasticidade do sarcolema, uma vez que permite a ligação do citoesqueleto à laminina da matriz extracelular (PICHAVANT *et al.*, 2011). Desta forma, na DMD a ausência da distrofina promove fragilidade e aumento da permeabilidade excessiva da membrana, desregulação da homeostase do cálcio e dano oxidativo (VENUGOPAL & PAVLAKIS, 2020).

A instabilidade do sarcolema durante a contração muscular, na DMD, facilita a entrada de grandes quantidades de íons cálcio na fibra. O excesso de cálcio promove a ativação inadequada de proteases, metaloproteases e fosfolipases que geram dano da fibra muscular levando à sua degeneração/mionecrose local. Outros estudos têm sugerido que proteínas reguladoras de cálcio, tais como calsequestrina e calmodulina, também podem estar envolvidas na patogênese da distrofia (FERRETTI *et al.*, 2009; PERTILLE *et al.*, 2010). Além disso, ocorre um intenso infiltrado inflamatório, com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio com consequente dano oxidativo e aumento da oxidação lipídica e proteica que gera mais danos a fibra (HORITA & CRUZ, 2015). No processo de mionecrose/regeneração da fibra ocorre uma substituição por tecido fibroadiposo, característico da pseudo-hipertrofia muscular (ROLLAND *et al.*, 2006; WHITEHEAD *et al.*, 2006; ERVASTI, 2007). À medida que ocorre a progressão da doença, os pacientes com DMD reduzem a capacidade regenerativa dos músculos, exacerbando a substituição do tecido conjuntivo e adiposo as fibras musculares, o que desencadeia perda da funcionalidade do tecido, e consequentemente redução da contração muscular (VENUGOPAL & PAVLAKIS, 2020).

As alterações estruturais no tecido muscular associadas à mionecrose e presença do infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e monócitos/macrófagos sugerem uma participação do sistema imunológico nesta miopatia. Além disso, a modulação na expressão dos componentes da matriz extracelular no microambiente muscular nas várias fases da doença (início, mionecrose, regeneração) indica um papel importante do conjuntivo no direcionamento das células inflamatórias para o foco da lesão muscular (SEIXAS *et al.*, 1997).

Clinicamente, os sintomas se iniciam na infância, por volta dos 2-3 anos até a adolescência. A patologia caracteriza-se por um inicial comprometimento funcional nos membros inferiores, com alterações na amplitude articular do quadril e joelho, limitação na dorsiflexão do tornozelo, atraso no desenvolvimento motor, alteração da marcha, fraqueza e pseudo-hipertrofia muscular (BAKKER *et al.*, 2002), caracterizando um déficit

musculoesquelético que compromete a funcionalidade motora, como de deambular, subir e descer (YIU & KORNBERG, 2015). A fraqueza muscular progressiva leva a quedas frequentes e perda da mobilidade até o final da adolescência, necessitando do uso de órteses e ventiladores, mas a progressão das complicações respiratórias e a falência cardíaca levam o paciente ao óbito na 2 ou 3 década de vida (FRAYSSE *et al.*, 2017).

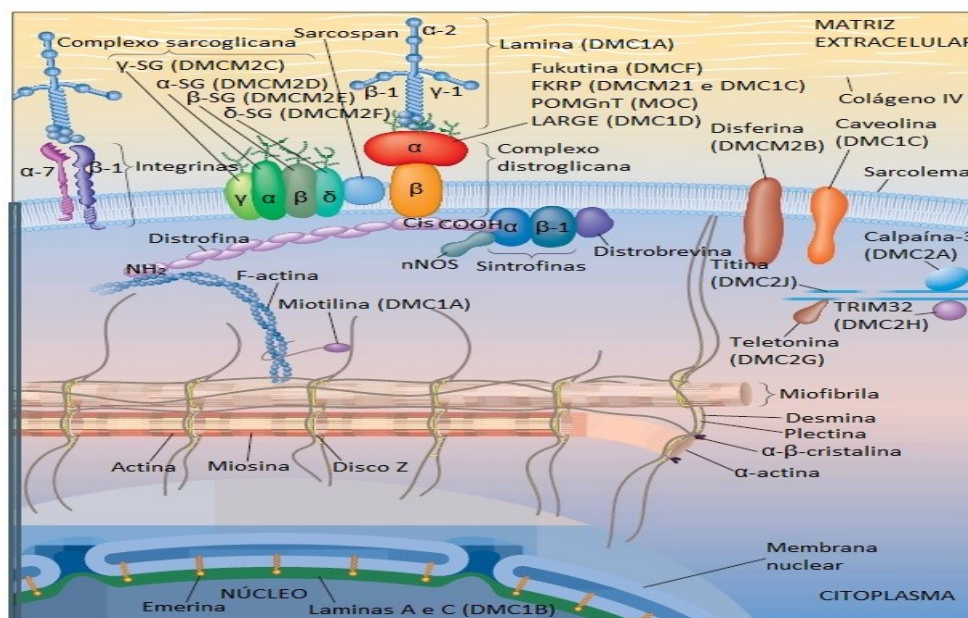
O diagnóstico pode ser estabelecido por meio de exame físico, análise histórico-familiar, exames laboratoriais e genéticos. Dentre as dosagens laboratoriais estão análise das enzimas creatino-cinase e piruvato-cinase, creatinina fosfoquinase sérica, aspartato animotransferase, alanina aminotransferase, desidrogenase láctica, enolase e anidrase carbônica III, transaminase glutâmica oxalacética, transaminase glutâmica pirúvica, entre outras. Também podem ser realizadas a eletroneuromiografia, eletrocardiograma e biópsia muscular na pesquisa molecular da mutação. Não existe cura para essa patologia, mas novas e promissoras terapias moleculares e farmacológicas estão sendo extensivamente estudadas (SARLO *et al.*, 2009; TANIGUTI, 2010; SIEMIONOW *et al.*, 2019).

O tratamento envolve medidas terapêuticas farmacológicas e não-farmacológicas para reduzir as incapacidades, prevenir complicações, prolongar a mobilidade e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (GUGLIERI & BUSHBY, 2010; GAIAD *et al.*, 2017). Com relação ao tratamento medicamentoso, não há evidência científica sobre o momento ideal para iniciar a medicação, no entanto, há indicações de quanto antes for feita maior é retardo da deterioração muscular. Os principais glicocorticóides usados são a prednisona e o deflazacort que demonstraram redução significativa do avanço da DMD, em até 3 anos, além de beneficiar a função pulmonar (HOUDE *et al.*, 2008). Porém, essa terapia gera muitos efeitos adversos, tais como ganho de peso, problemas oculares, hipertensão, diabetes, redução da imunidade e mudanças metabólicas e comportamentais, além de que, alguns pacientes não toleram essa terapia em longo prazo (CAMPBELL & JACOB, 2003; CIAFALONI & MOXLEY, 2008).

Alguns estudos trazem perspectivas de novas formas de tratamento para essa doença, como o ataluren e tecnologias de edição gênica. O ataluren é uma droga de uso oral que atua a nível do ribossomo, promovendo a leitura através de códons de parada prematuros devido a mutações sem sentido, produzindo uma proteína de tamanho normal. Apesar dos resultados promissores, em teste clínico de fase II e aprovação condicional pela Agência Europeia de Medicamentos, desde 2014, para tratar pacientes sem graves acometimento da marcha com cinco anos ou mais, esta droga ainda não foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e nem pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasileira (ANVISA), não sendo usada no território nacional (BUSHBY *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2017; ORTEZ *et al.*,

2019). Já a tecnologia de adição gênica, o CRISPR/Cas9 ainda em fase de testes em animais, traz uma medida terapêutica curativa promissora para a doença, por meio da eliminação permanente da mutação do gene, com conseqüente formação adequada da leitura proteica. Os testes *in vivo*, mostraram que esta terapia promoveu a remoção do exon 23 mutado do gene dos camundongos *mdx*, com restauração da distrofina, tanto em músculos esqueléticos quanto cardíacos, porém ainda são necessários verificações de segurança e eficácia para uso humano (CHAMBERLAIN & CHAMBERLAIN, 2017; WONG & COHN, 2017; ORTEZ *et al.*, 2019). Desta forma, o caráter progressivo da DMD e ainda a ausência de tratamentos efetivos estimulam os estudos básicos e clínicos voltados para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas tanto farmacológicas, nutricionais, moleculares e gênicas (BOGDANOVICH *et al.*, 2004; PAYNE *et al.*, 2006).

Figura 1 – Conceito em vigor da organização molecular do complexo distroglicana no sarcolema extrajuncional.



Fonte: Dalakas, (2011) (Seward Hung.)

2.2 Modelo experimental de Distrofia muscular de Duchenne

Em 1984 foi identificada a linhagem *mdx* (*X-chromosome linked muscular dystrophy*) na colônia C57BL10/ScSn, a qual apresentava níveis elevados das enzimas creatina-quinase e piruvato-quinase e degeneração muscular característica de DMD (BULFIELD *et al.*, 1984; LEFAUCHEUR *et al.*, 1995), sendo até hoje o modelo animal mais utilizado no estudo das distrofias (WILLMANN *et al.*, 2009). Os animais apresentam

mutação espontânea no cromossomo X, assim como na doença humana, mas o gene da distrofina está localizado na região Hq Bpa deste cromossomo onde são afetados pela doença machos e fêmeas homocigóticos, viáveis e férteis, contudo as fêmeas são apenas portadoras da mutação (BULFIELD *et al.*, 1984; ENGEL *et al.*, 1994).

Apesar dos camundongos *mdx* apresentarem mutação no cromossomo homólogo ao humano, o fenótipo desenvolvido neste modelo é menos severo do que a DMD (GROUNDS *et al.*, 2008). Diferente da doença humana, os animais apresentam ciclos de regeneração muscular após um período de mionecrose, reduzida deposição de tecido fibroadiposo, alterações morfológicas moderadas, função mecânica menos comprometida e sobrevivência semelhante a outros animais normais (BULFIELD *et al.*, 1984; GROUNDS *et al.*, 2008). Mas embora exista essas limitações neste modelo experimental, o camundongo *mdx* é o modelo mais aceito para estudos sobre a DMD, devido a sua característica genética com depleção da distrofina e consequente mionecrose, além da grande disponibilidade, fácil adaptação, baixo custo de produção e manutenção em laboratório quando comparado a outros modelos experimentais de mamíferos (SASAKA *et al.*, 2003; GROUNDS *et al.*, 2008).

O perfil muscular do camundongo *mdx* apresenta-se semelhante ao músculo esquelético dos portadores humanos da DMD por volta dos 2 anos de idade, com uma prevalência da degeneração muscular (LEFAUCHER *et al.*, 1995). Em análise histopatológica detalhada foi observado que os músculos dos membros posteriores, especialmente o sóleo e o tibial são os mais afetados por necrose, enquanto outros locais como os músculos laríngeos e extraoculares são poupados (COIRAULT *et al.*, 2003; SHAVLAKADZE *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que a partir do sétimo dia pós-natal, os camundongos já apresentam regeneração das fibras musculares em cerca de 0,62%, sendo o diafragma um dos primeiros músculos acometidos. Entre o décimo quarto a vigésimo dia pós-natal, as principais alterações histopatológicas são necrose e infiltrado inflamatório, com cerca de 2,2% a 5% de fibras atingidas, período caracterizado como estado pré-necrótico (SEIXAS *et al.*, 1997; MINATEL *et al.*, 2003; PORTER *et al.*, 2003).

O músculo tibial apresenta extensas áreas de necrose, especialmente no período entre o vigésimo a trigésimo dia de vida, com contínua regeneração/degeneração (SHAVLAKADZE *et al.*, 2004). A mionecrose atinge seu ápice entre a trigésima quinta a nonagésima semana pós-natal, comprometendo mais de 50% das fibras dos músculos estriados e cardíacos. Após os 120 dias de idade, no camundongo *mdx* idoso praticamente todas as fibras dos músculos encontram-se com focos de mionecrose, inflamação e regeneração (TANABE *et al.*, 1986; BRIGUET *et al.*, 2004), onde a DMD fica mais severa, semelhante ao humano, com

comprometimento grave ao diafragma, maior deposição fibroadiposa muscular e redução da sobrevida (LEFAUCHER *et al.*, 1995). Desta forma, o camundongo *mdx* se torna um excelente modelo para o estudo dos mecanismos patogênicos da mionecrose e regeneração da DMD, possibilitando inclusive, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes (SEIXAS *et al.*, 1997; WILLMANN *et al.*, 2009).

2.3 Proteínas marcadoras de estresse celular e de citoproteção

As células estão constantemente submetidas a diversas situações adversas e ambientes de estresse, e diversas estratégias foram desenvolvidas a fim de manter a homeostase celular. Entre essas estratégias existem mecanismos específicos que levam a uma rápida transcrição e subsequente tradução de uma série de proteínas altamente conservadas, denominadas genericamente de proteínas de estresse (LOCKE *et al.*, 1990; WELCH, 1992), ou mais precisamente de *Heat Shock Proteins* (HSPs) (RITOSSA, 1962; LOCKE & NOBLE, 1995; DE MAIO *et al.*, 2011). As HSPs são proteínas essenciais na sobrevivência e na citoproteção celular, que surgem na literatura como uma das classes de proteínas de estresse mais bem estudadas.

Em 1962, Feruccio Ritossa descobriu que a exposição de glândulas salivares de *Drosophila busckii* ao calor, dinitrofenol ou salicilatos promovia o espessamento, em cromossomos, que representava sítios específicos de transcrição. Assim, ficou determinado que quando as células passam por um estresse térmico ou químico, que ultrapassa o limiar de adaptação celular, há aumento da expressão de genes, com consequente síntese dessa classe de proteínas, denominadas de HSP, ou proteínas de estresse (RITOSSA, 1962). Posteriormente a descoberta, verificou que este fenômeno ocorre na maioria dos seres vivos (JAATTELÄ & WISSING, 1992; SANTORO, 2000), sendo ativas tanto em condição de calor quanto outras que causam alteração homeostática, tais como exposição a metais pesados, aumento na concentração de cálcio intracelular, diminuição de glicose, infecções virais e bacterianas, hipóxia, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), presença de toxinas ou mediadores inflamatórios e outros (WELCH, 1992; YELLON & MARBER, 1994; ACUNZO *et al.*, 2012; GRUNWALD *et al.*, 2014; WEBSTER *et al.*, 2019).

As HSP são uma grande classe de proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, sendo classificadas em famílias com base no peso molecular, tais como HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e *small* HSP (20-40kDa). Entre as diferentes funções específicas

desenvolvidas em cada família, as chaperonas são responsáveis por auxiliar na formação, dobramento, transporte, desdobração de proteínas nascentes ou desnaturadas e na degradação celular de proteínas inativas/defeituosas (STUART *et al.*, 1994; TERLECKY, 1994; SLIMEN *et al.*, 2016).

Dentre as diferentes HSPs, a HSP70 (ponto isoelétrico entre pH 5,2 e 6,3) é a mais conservada filogeneticamente, sendo a mais estudada, pois desempenha papel essencial na resposta celular do organismo, para manter as condições fisiológicas das células (FEDER & HOFMANN, 1999; DEANE & WOO, 2011). A expressão de HSP70 ocorre de forma constitutiva, sendo rapidamente induzida quando as células são expostas a agentes estressores, incluindo variações bruscas de temperatura e oxigênio, exposições a agentes tóxicos e poluentes, privação de glicose, influxo de cálcio e outros (WEBER & JANZ, 2001; PORTER & JANZ, 2003; KAMPINGA *et al.*, 2009). Nestas condições, a HSP70 integram um mecanismo de defesa celular complexo, desempenhando, entre outras funções o dobramento de proteínas recém-sintetizadas; translocação de membrana; desmontagem de complexos de proteínas; prevenção de agregação e solubilização e redobramento de proteínas agregadas; impede a desnaturação de proteínas ou auxilia na degradação de proteínas desnaturadas/defeituosas. Além disso, a HSP70 e suas co-chaperonas podem atuar na regulação da apoptose, inibindo-a ou promovendo-a dependendo da lesão celular causada pelo agente estressor (CARNEVALI & MARADONNA, 2003; PARCELLIER *et al.*, 2003; TAKAYAMA *et al.*, 2003; ROSENZWEIG *et al.*, 2020). As funções desenvolvidas pela HSP70 podem operar em diferentes modos e necessitar da cooperação de várias outras maquinarias celulares, como as outras HSPs (ROSENZWEIG *et al.*, 2020).

Neste sentido, a HSP70 devido a sua versatilidade e rápida resposta a vários estímulos estressantes são as proteínas mais utilizadas como marcadores de estresse, em ensaios biológicos (COLE & MEYERS, 2011). As principais isoformas representantes do grupo HSP70 são a HSP73 e HSP72. A primeira é expressa constitutivamente em todas as células e está presente tanto no núcleo como no citoplasma celular (BECKMANN *et al.*, 1990). Enquanto, a HSP72 é o principal membro expresso em resposta ao estresse, sendo verificado um aumento significativo dos seus níveis até seis horas após a exposição ao fator estressante e tem funções citoprotetora e anti-inflamatória (HAMILTON *et al.*, 2004; ATALAY *et al.*, 2009; HECK *et al.*, 2011). Sua ação anti-inflamatória apresenta como mecanismo principal a ação inibitória sobre a ativação e translocação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (ASEA & DE MAIO, 2007), apresentando papel crucial nos processos inflamatórios e em fatores

reguladores da sobrevivência celular e da apoptose (RAN & LU, 2004; ROSENZWEIG *et al.*, 2020). Neste sentido, a identificação da expressão da HSP70 se mostra essencial em estudos de toxicidade, visto que essa proteína responde prontamente na citoproteção contra agentes tóxicos.

2.4 As Plantas Medicinais Brasileiras

O Brasil possui uma grande biodiversidade e um rico patrimônio genético, ocupando o primeiro lugar em todo o mundo (JOLY *et al.*, 2011). Essa riqueza genética tem despertado grande interesse das comunidades científicas tanto nacionais quanto internacionais (DE SOUZA & FELFILI, 2006). Mas apesar desta vasta biodiversidade, ainda não se conhece precisamente sua proporção e potencial farmacoeconômico (JOLY *et al.*, 2011; NEWMAN & CRAGG, 2016). Com destaque especial, as plantas têm grande variabilidade de aplicações no cotidiano, tais como alimentícia, madeira, fonte econômica, uso medicinal e farmacológica. Muitas espécies nativas brasileiras, com poder medicinal, têm sido utilizadas tanto empiricamente pela população quanto usada como matéria-prima bruta, protótipo e modelo para a síntese de substâncias bioativas para a fabricação de fármacos, fitoterápicos e outros agentes terapêuticos (MACIEL *et al.*, 2002; SCHULZ *et al.*, 2002; ARNOUS *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2007; FIRMINO & BINSFELD, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), planta medicinal é "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos" (OMS, 1998). E grande parte da população mundial utiliza plantas em sua terapêutica caseira, sendo estimado que vinte e cinco mil espécies são utilizadas na medicina popular tradicional brasileira (RODRIGUES *et al.*, 2004). Assim, o uso do conhecimento tradicional associado às formas de utilização e suas aplicações terapêuticas são muito úteis para o direcionamento dos estudos científicos nas áreas de farmacologia, fitoquímica e química medicinal (MONTEIRO *et al.*, 2007).

Muitos estudos têm direcionado enfoque na pesquisa biomonitorada de compostos bioativos complexos, derivados de plantas medicinais, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química (CARVALHO *et al.*, 2013). Esses compostos têm demonstrado grande potencial biológico, especialmente para a atividade antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (THAKUR *et al.*, 2011). Além da busca por moléculas no

desenvolvimento de protótipos farmacológicos, atualmente na medicina moderna, tem crescido o estudo e a busca de drogas fitoterápicas. Isso porque os fitoterápicos, além de fornecerem os mesmos resultados terapêuticos na prevenção, cura ou minimização dos sintomas podem apresentar maior disponibilidade e baixo custo (TOLEDO *et al.*, 2003). Entretanto, ainda faltam investimentos no Brasil, para o desenvolvimento da área de fitoterápicos, sendo que grande parte das plantas medicinais nativas ainda não tem estudos científicos quanto à eficácia e segurança (MACIEL *et al.*, 2002; FOGLIO *et al.*, 2006; HIGUCHI, 2007).

2.5 Importancia da avaliação da toxicidade de plantas

Desde primórdios, as plantas têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, e apesar do fortalecimento da indústria farmacêutica, atualmente vem crescendo a procura e consumo de produtos naturais, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). Ocasionalmente uma mesma planta pode apresentar tanto ação terapêutica quanto tóxica. A distinção entre as substâncias ativas e tóxicas depende do modo de preparo, dose, concentração, estado de dispersão (forma e tamanho das partículas), solubilidade nos fluidos orgânicos e afinidade ao tecido ou organismo (MORGAN, 2003; CAZARIN *et al.* 2004)

Infelizmente, até hoje perdura um sentimento e a crença, especialmente em relação às plantas medicinais, de que seu uso não causa nenhum mal, mas muitas espécies vegetais são extremamente tóxicas e nocivas à saúde humana (CAMPOS *et al.*, 2016). Deve-se ter em mente que somente o uso popular não é suficiente para garantir a eficácia e, especialmente a segurança de sua utilização, pois seu uso indiscriminado pode desencadear doenças agudas e crônicas, de acordo com a parte utilizada, forma de uso, dose e tempo de utilização. Assim, estudos científicos que comprovem estas características se fazem extremamente necessários (MACIEL *et al.*, 2002; HIGUCHI, 2007).

As plantas contêm vários compostos bioativos, chamados metabolitos secundários, dentre eles os alcalóides, glicosídeos cardioativos, glicosídeos cianogênicos, taninos, saponinas, lactonas sesquiterpenas, oxalato de cálcio e toxialbuminas, que podem provocar efeitos tóxicos dependendo da concentração e estado de oxidação em que se encontram (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). O metabolismo secundário representa um elo químico entre as plantas e o ambiente, onde a síntese dos diferentes compostos é diretamente afetado pelas condições ambientais (sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, solo, altitude

incidência de pragas e outros), além de ser afetado pelo estágio de desenvolvimento da planta (KUTCHAN, 2001; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Grande número de intoxicações causadas por plantas no Brasil tem ocorrido, em 2012 foram registrados cerca de 1026 casos, segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). Os problemas deste tipo de intoxicação, seja ela aguda ou crônica, é a dificuldade do diagnóstico correto, sendo que a associação entre os sintomas e o consumo da espécie vegetal é difícil de ser estabelecida (CAMPOS *et al.*, 2016). Desta forma, o uso indiscriminado de plantas ditas medicinais, passou a ser um problema de saúde pública (SIMÕES *et al.*, 2003). Por isso, estudos na área de toxicologia e farmacologia de plantas têm recebido a atenção dos cientistas, especialmente na investigação da toxicidade, *in vitro* e *in vivo* (REBECCA, 2002; BRANDÃO *et al.*, 2008).

Os testes toxicológicos são realizados para se obter dados sobre os efeitos tóxicos, condições e natureza desses efeitos, além de mensurar níveis seguros de exposição (MEYER, 2003). Estes estudos aplicados em animais de laboratório, sob condições estabelecidas e controladas, permitem determinar os possíveis efeitos das substâncias em humanos ou animais expostos. Assim, o uso seguro das plantas medicinais, necessita de testes, tanto de eficácia, quanto de segurança e toxicidade. Os modelos de estudos toxicológicos, *in vivo*, incluem ensaios de toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade e indução de dependência (BRASIL, 2004).

O teste de toxicidade aguda em dose única, segundo as diretrizes do *Guideline 423* do *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2001) tem por objetivo avaliar efeitos adversos em um breve período após a administração de uma substância. Neste protocolo, pelo menos três animais devem ser observados a cada hora nas primeiras 24 horas após a administração, isso porque as manifestações agudas, geralmente ocorrem neste intervalo de tempo. E, segundo o protocolo essa observação deve ser mantida por pelo menos 14 dias, uma vez que os efeitos tóxicos podem surgir ao longo dos dias (DIPASQUALE & HAYES, 2001).

O *screening* hipocrático, utilizado nos testes de toxicidade aguda, *in vivo*, é um ensaio bastante útil e muito empregado na triagem de plantas medicinais, para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas. Este teste consiste na avaliação comportamental sobre o estado de consciência, disposição, atividade geral, coordenação motora, reflexos, atividades do sistema nervoso central (SNC) e autônomo (SNA) correlacionando possíveis

efeitos farmacológicos e tóxicos de substâncias desconhecidas (ALMEIDA *et al.*, 1999; LUCIO *et al.*, 2000). Além disso, este teste pode ser associado à determinação da dose letal média ou de 50% (DL₅₀), sendo uma maneira eficaz de se avaliar as doses terapêuticas e não-tóxicas de um composto. Assim, a toxicidade pode ser determinada em curto prazo (toxicidade aguda) ou longo prazo (toxicidade doses repetidas) dependendo do uso farmacológico desejado (QUEIROZ, 2015).

2.6 Família Melastomataceae e o Gênero *Miconia* sp.

A família Melastomataceae compreende uma das mais importantes famílias botânicas da flora neotropical, constituída de cerca de 5.000 espécies distribuídas em 11 tribos e 185 gêneros (RENNER *et al.*, 2020). Apresenta principalmente espécies arbustivas e árvores de média a grande porte (ROMERO & MARTINS, 2002; JUDD *et al.*, 2010), com características botânicas específicas, tais como folhas opostas simples, geralmente curvinérvias, inflorescências terminais ou axilares vistosas bissexuadas, dialipétalas, períginas ou epíginas com estames em número duplo ao de pétalas (SOUZA & LORENZI, 2005).

Devido a sua facilidade de adaptações a ambientes adversos, grande produção de sementes, eficiente dispersão dos propágulos, altas taxas de germinação e crescimento rápido (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013), as espécies desta família são muito usadas para diferentes fins, tais como reflorestamento de áreas degradadas, fonte alimentícia de pássaros, exploração da madeira, uso ornamental, confecção de artesanatos e uso medicinal (CRUZ & KAPLAN, 2004; ALMEIDA & BANDEIRA, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

Dentre os gêneros desta família, o gênero *Miconia* Ruiz & Pav., concentra cerca de 30% das espécies (REZENDE, 2012; GOLDENBERG & CADDAM, 2013; 2015), com grande distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (RENNER *et al.*, 2020). Em Minas Gerais são encontrados aproximadamente 29 gêneros e 342 espécies desta família, com 86 espécies pertencentes apenas ao gênero *Miconia* (BAUMGRATZ *et al.*, 2010; REZENDE, 2012; BAUMGRATZ *et al.*, 2014). Muitas dessas espécies apresentam uso medicinal, principalmente, na forma de infuso e garrafadas hidroalcoólicas das folhas e flores para tratamento de doenças inflamatórias, infecciosas e analgesia (CRUZ & KAPLAN, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008; ALMEIDA & BANDEIRA, 2010). Contudo, apesar da diversidade desse gênero, poucas espécies foram exploradas quanto ao seu potencial químico e biológico.

Alguns estudos com espécies deste gênero têm mostrado seu perfil químico rico em compostos fenólicos, pertencentes as classes dos flavonoides, taninos, triterpenos, cumarinas,

benzoquinonas e fenólicos (CUNHA *et al.*, 2003a; b; ZHANG *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2007; MANCINI *et al.*, 2008; SERPELONI *et al.*, 2008a; b; RODRIGUES *et al.*, 2011), com identificação e isolamento dos famosos triterpenos pentacíclicos, os ácidos ursólico e oleanólico, como constituintes majoritários, encontrados na forma de mistura isomérica, e responsáveis por diversos efeitos biológicos/farmacológicos relatados na literatura (LIN *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2003a; DINIZ *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2010). A grande biodiversidade química destas espécies decorre do local de cultivo, em especial no bioma do Cerrado, onde ocorre uma variedade de ambientes com diferentes tipos de solos, relevo e fitofisionomias (RIBEIRO & WALTER, 2008). Além disso, o Cerrado, devido a suas características adversas estressantes, tais como secas prolongadas, queimadas periódicas e solo pobre em muitos minerais são observadas maiores produções de metabolitos secundários, a fim de estabelecer adaptação/sobrevivência as essas condições impostas do ambiente (SILVA *et al.*, 2010; DOS SANTOS, 2015).

Quanto ao potencial biológico, as espécies deste gênero tem mostrado efeitos antioxidante (PIERONI *et al.*, 2011; LIMA, 2016; CRUZ, 2017; GONTIJO *et al.*, 2019); antimutagênicos (RESENDE *et al.*, 2006; SERPELONI *et al.*, 2008a); antimicrobianos (LI *et al.*, 2001; CELOTTO *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008; GONTIJO *et al.*, 2019; VIEGAS *et al.*, 2019; CUNHA *et al.*, 2020); antitumorais (GUNATILAKA *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2008; SERPELONI *et al.*, 2008b; BARROSO, 2015; CORDOBA, 2017; SILVA *et al.*, 2020); antiparasitários (CUNHA *et al.*, 2003a; CUNHA *et al.*, 2006; PEIXOTO *et al.*, 2011; VIEGAS *et al.*, 2019); analgésicos e anti-inflamatórios (CUNHA *et al.*, 2003b; SPESSOTO *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; GATIS-CARRAZZONI *et al.*, 2018). No Quadro 1 encontra-se reunido uma síntese de alguns destes estudos. Dentre as espécies de uso medicinal e com potencial biológico demonstrado em estudos *in vitro*, se destaca a *Miconia ferruginata* DC., espécie foco deste estudo.

Quadro 1 – Perfil químico e atividades biológicas de espécies do gênero *Miconia* sp.

Espécie	Perfil químico/compostos isolados	Atividade biológica	Referência
<i>M. lepidota</i> DC.	Benzoquinonas	Antitumoral	GUNATILAKA <i>et al.</i> , 2001
<i>M. albicans</i> (Sw.) Triana, <i>M. rubiginosa</i> (Bonpl.) DC. e <i>M. stenostachya</i> DC.	Flavonoides e Triterpenos ácidos (ursólico e oleanólico)	Antimicrobiana	CELOTTO <i>et al.</i> , 2003
<i>M. fallax</i> DC. e <i>M. stenostachya</i> DC.	Triterpenos ácidos (ursólico, oleanólico e gipsogênico)	Tripanocida	CUNHA <i>et al.</i> , 2003a
<i>M. ligustroides</i> (DC.) Naudin	Triterpenos (α e β -amirina) e esteroide (β -sitosterol)	Analgésica	CUNHA <i>et al.</i> , 2003b
<i>M. rubiginosa</i> (Bonpl.) DC.	Triterpenos (α e β -amirina, lupeol) e esteroide (β -sitosterol)	Analgésica	SPESSOTO <i>et al.</i> , 2003
<i>M. sellowiana</i> Naudin.	Triterpenos ácidos (ursólico, urjinólico, oleanólico, máslico)	Tripanocida	CUNHA <i>et al.</i> , 2006
<i>M. albicans</i> (Sw.) Triana	Triterpenos ácidos (ursólico e oleanólico)	Anti-inflamatório e analgésico	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2006
<i>M. fallax</i> DC.	Triterpenos ácidos (ursólico e oleanólico)	Antitumoral	CUNHA <i>et al.</i> , 2008
<i>Miconia alypifolia</i> Naudin	Flavonoides	Antioxidante	MANCINI <i>et al.</i> , 2008
<i>M. cabucu</i> , <i>M. rubiginosa</i> (Bonpl.) DC., e <i>M. stenostachya</i> DC.	Flavonoides	Antimicrobiano	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2008
<i>M. ligustroides</i> (DC.) Naudin	Triterpenos ácidos (ursólico e oleanólico)	Antimicrobiano	CUNHA <i>et al.</i> , 2010
<i>M. langsdorffii</i> Cogn.	Triterpenos ácidos (ursólico e oleanólico)	Leishmanicida	PEIXOTO <i>et al.</i> , 2011
<i>M. albicans</i> (Sw.) Triana	Flavonoides	Antioxidante	PIERONI <i>et al.</i> , 2011
<i>M. fallax</i> DC.	Triterpenos ácidos (ursólico e oleanólico)	Tripanocida	FERREIRA <i>et al.</i> , 2013
<i>M. latecrenata</i> (DC.) Naudin	Taninos (elagitanino)	Antioxidante, antimicrobiana e antimutagênica	GONTIJO <i>et al.</i> , 2019
<i>M. willdenowii</i> Klotzsch ex Naudin	Benzoquinona (primin)	Leishmanicida e antimicrobiana	VIEGAS <i>et al.</i> , 2019
<i>M. minutiflora</i> (Bonpl.) DC.	Ácido elágico, galotanino e terpenos	Anti-inflamatória e antinociceptiva	GATIS-CARRAZZONI <i>et al.</i> , 2019
<i>M. chamissois</i> Naudin	Flavonoide (matteucinol)	Antitumoral	SILVA <i>et al.</i> , 2020

2.7 *Miconia ferruginata* DC.

A *Miconia ferruginata* DC., da família Melastomataceae (Figura 2) é uma espécie nativa do cerrado e da caatinga, pertencente ao quadro de plantas medicinais utilizadas na região dos Vales Jequitinhonha e Mucuri. Esta espécie é popularmente conhecida como pixirica-do-campo ou babatenã, muito utilizada na forma de infuso e banhos (ALMEIDA & BANDEIRA, 2010), para tratamento de dermatites, inflamação e doenças parasitárias e infecciosas (CRUZ & KAPLAN 2004; ZANDONÁ, 2009). A sua distribuição ocorre nos estados do Pará, Tocantins, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Sergipe, Bahia, Pernambuco e Minas Gerais (GOLDENBERG & CADDHAH, 2013). Em Minas, esta espécie é encontrada, especialmente nos campos rupestres, Cerrado sentido restrito, especialmente em áreas de altitude elevada (SANTOS, 2003). Rezende *et al.* (2014), realizou sua descrição botânica sistemática:

“*Miconia ferruginata* DC. caracteriza-se pelos ramos bastante robustos, rugosos, com estrias bem evidentes, grandes inflorescências escorpioides (14-38,5 cm comprimento.) e folhas discolors geralmente grandes (7-32,5 x 2,5-13 cm), indumento ferrugíneo (ocráceo) recobrimdo toda a planta, baga imatura verde oliva e enegrecida quando madura, com cerca de 50 sementes por fruto e conectivo prolongado das tecas (0,6 mm comprimento), espessado no dorso com expansão dorso-basal e dois apêndices ventrais e baga verde-oliva a enegrecida, com cerca de 50 sementes.” (REZENDE *et al.*, 2014).

Segundo os estudos fitoquímicos clássicos foi apontado a presença das classes de flavonoides, saponinas, cumarinas, terpenos e taninos nas folhas (LIMA *et al.*, 2013), e por meio de técnicas hifenadas foi verificado a presença de flavonóis, flavonas, ácidos fenólicos e catequinas nos extratos e frações das folhas e do caule, enquanto os terpenos (β -caricofileno e α -húmuleno), ácido cafeoilquínico e monocafeoilquinico foram encontrados somente nas folhas (BARROSO, 2015; BARROSO *et al.*, 2017), além dos triperpenos (ácidos ursólico e oleanólico) e a flavona (5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona) nas folhas (CUNHA *et al.*, 2020). Alguns destes compostos já foram relatados apresentar atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (GREGÓRIO *et al.*, 2005; LEGAULT & PICHETTE, 2007; CAZAROLLI *et al.*, 2008; BARROSO 2015; LIMA, 2016; CORDOBA, 2017; CRUZ, 2017; LUO *et al.*, 2019).

Nos estudos *in vitro*, foram apontados o potencial antimicrobiano, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatório dos extratos e compostos isolados das folhas e do caule de *M. ferruginata* (OLIVEIRA, 2010; BARROSO 2015; LIMA, 2016; CORDOBA, 2017; CRUZ, 2017; CUNHA *et al.*, 2020). No estudo realizado por Barroso (2015) foi demonstrado que os extratos etanólicos e aquosos das folhas e do caule apresentaram elevada citotoxicidade sobre as células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), associada a baixa toxicidade sobre as fibroblastos normais de murinos (L929), mostrando elevada seletividade e possível atividade antitumoral dos extratos brutos. Além disso, neste estudo também verificou uma elevada inibição proliferativa de linfócitos do sangue periférico humano dos extratos aquosos das folhas e do caule, com uma eficácia de 2,5 vezes em comparação à do fármaco dexametasona, apontando um possível efeito anti-inflamatório desta espécie.

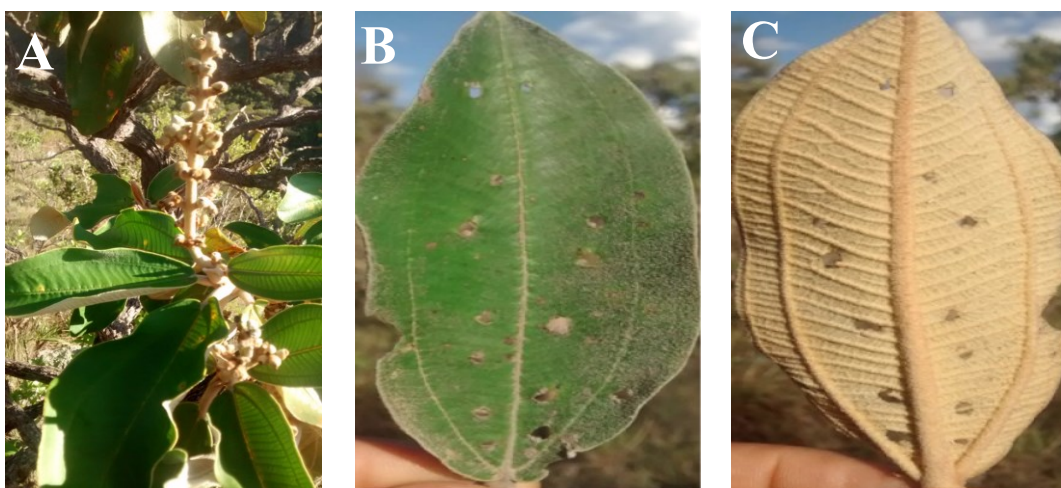
No estudo conduzido por Cordoba (2017), mostrou elevado potencial seletivo e citotóxico dos extratos etanólicos e aquosos do caule sobre as células de leucemia linfocítica (Jurkat), apontando que o possível mecanismo de ação antitumoral está relacionado a indução de morte por apoptose e retenção das células tumorais na fase G0/G1 do ciclo celular. O efeito citotóxico também foi observado sobre as linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-435) e câncer de cólon (HCT-8), com inibição superior a 90% para os triterpenos isolados das folhas de *M. ferruginata*, na forma semi-sintética (metilada), além de inibição da catepsina B, enzima associada a capacidade metastática das células tumorais (OLIVEIRA, 2010).

A atividade antimicrobiana foi apontada por Cunha *et al.* (2020), que verificou concentração inibitória mínima (CIM) entre 250 a 500 µg/mL para os triterpenos ácidos ursólico e oleianóico isolados, sobre as cepas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Enquanto, para Barroso (2015), os extratos brutos não foram considerados ativos sobre diferentes cepas bacterianas avaliadas, pois acima da faixa de concentração de 500 µg/mL, os extratos já apresentavam toxicidade sobre células normais.

E nos estudos realizados por Lima (2016) e Cruz (2017), foi verificado elevada capacidade antioxidante dos extratos do caule e das folhas, respectivamente, por meio de testes de DPPH e ABTS. A capacidade antioxidante foi associada ao elevado conteúdo de compostos fenólicos presentes no extrato etanólico bruto. Nestes estudos, também foi observado que os extratos promoveram uma elevada redução do *burst* respiratório de neutrófilos, reforçando o potencial antioxidante e, provavelmente, anti-inflamatório desta espécie. Além disso, os compostos identificados, tais como os das classes de flavonoides, terpenos e taninos já foram relatados como tendo propriedades antioxidantes e anti-

inflamatórias, o que pode corroborar com os dados biológicos encontrados nos estudos *in vitro* (OLIVEIRA, 2010; LIMA *et al.*, 2013; BARROSO, 2015; LIMA, 2016; CORDOBA, 2017; CRUZ, 2017). Assim, o potencial antioxidante e anti-inflamatório *in vitro* da espécie *M. ferruginata* tem sido evidenciado na literatura, estimulando novas pesquisas que validem o seu potencial farmacológico e aplicação terapêutica em doenças inflamatórias crônicas. Desta forma, esta pesquisa teve o intuito de avaliar a toxicidade aguda dos extratos aquosos das folhas e determinar uma dose não-tóxica e que apresente atividade terapêutica sobre o modelo experimental da distrofia de Duchenne, *in vivo*.

Figura 2 – Fotografia das folhas de *Miconia ferruginata*.



A - Espécie *Miconia ferruginata* coletada no cerrado sentido restrito do Distrito de Diamantina; B e C – Detalhes das folhas. Fonte: Fotos de Machado, A. S. D. (2018).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito terapêutico de diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginta* sobre os parâmetros clínicos, morfológicos, regenerativos e anti-inflamatórios, e determinar a toxicidade aguda em dose única em modelo animal *mdx* da distrofia muscular de Duchenne.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos aquosos das folhas da espécie *M. ferruginata*;
- Realizar avaliação comportamental com relação ao sistema motor, reflexos, SNC e SNA dos animais, por meio de *screening* hipocrático;
- Determinar a dose letal de 50% (DL₅₀) do extrato aquoso da *M. ferruginata*.
- Analisar alterações morfológicas e histológicas teciduais no fígado, pulmão e músculo esquelético (tibial anterior);
- Determinar a quantidade de fibrose tecidual no fígado, pulmão e músculo esquelético (tibial anterior);
- Avaliar a expressão imunohistoquímica de proteínas de stress (HSP70) e anti-apoptótica (MCL-1) nos tecidos do fígado, pulmão e músculo esquelético (tibial anterior).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação taxonômica

A espécie *M. ferruginata* foi coletada na região norte de Minas Gerais pela Ms. Poliana Ribeiro Barroso, na comunidade Ribeirão de Areia, Diamantina – MG no dia 23 de maio de 2015. A espécie não consta da Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014a). O material coletado foi georeferenciado e o *voucher* foi depositado no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) da UFVJM, sob o número de registro HDJF2405. A identificação foi realizada pelo Dr. Evandro Luiz Mendonça Machado. A autorização para coleta de plantas foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente (número de registro 64300-13) e o acesso ao patrimônio genético pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN AACD7CF/2018).

4.2 Preparo dos extratos

Os procedimentos de obtenção do material vegetal e preparo do extrato foram realizados no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do departamento de Farmácia da UFVJM. O material vegetal foi estabilizado e seco em estufa de ar circulante (Biopar® S480AT, São Paulo – SP, Brasil) a cerca de 40°C, por 14 dias, posteriormente, pulverizado com auxílio de moinho de facas (Marconi® MA580, São Paulo – SP, Brasil) e, armazenados em sacos plásticos, em local fresco, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O extrato aquoso foi preparado conforme realizado por Barroso (2015), no qual utilizando 50 g do material pulverizado exposto a 500 mL de água Milli-Q fervente, por meio de infusão (1:10 p/v), deixado em contato por 15 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, o infuso foi filtrado em algodão, congelado em nitrogênio líquido e seco em liofilizador (Terroni® LS 3000, São Paulo – SP, Brasil). O extrato obtido foi transferido para frascos âmbar previamente tarados, e armazenado em local seco e protegido da luz. O peso final do extrato (3.39 gramas), resultou em rendimento final de 6.78%.

4.3 Animais

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (NEA/FCBS) da UFVJM, seguindo as diretrizes de experimentação animal do Comissão de Ética do uso de animais (CEUA) da UFVJM e as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (NEVES *et al.*, 2013). A pesquisa foi aprovada pelo CEUA da UFVJM sob número de protocolo 012/2019. Foram utilizados camundongos fêmeas segundo recomendação do *Guideline 423 da Organization of Economic Co-operation and Development* (OECD) referência internacional para o estudo de toxicidade aguda de substâncias de composição desconhecida (OECD, 2001). A utilização de um único sexo, especialmente de fêmeas ocorre porque pesquisas de literatura de testes de dose letal de 50% (DL₅₀) mostraram que, embora exista poucas diferenças entre os sexos, geralmente as fêmeas são um pouco mais sensíveis a reações tóxicas que os machos (LIPNICK *et al.*, 1995; OECD, 2000).

Os animais utilizados foram da linhagem C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J criados no biotério do NEA/FCBS, pesando entre 20-40 g, com 1 ano de idade. Foi escolhido esta idade nas avaliações, pois neste período o perfil de degeneração da distrofia muscular de Duchenne é semelhante a doença humana. Os casais matrix foram adquiridos comercialmente no Instituto Fio Cruz - RJ. Os animais foram mantidos em caixas plásticas forradas com serragem, sob ciclo invertido de claro/escuro de 12 horas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ração e água *ad libitum*, durante todo o período experimental. Os animais foram submetidos a um período de aclimação de sete dias antes do início do experimento para a certificação do estado de higidez, comportamento, hábitos alimentares e fisiológicos normais da espécie.

4.4 Grupos experimentais

Foram utilizados 18 fêmeas não-isogênicas, nulíparas e não-gravidas separadas aleatoriamente em 6 grupos experimentais com 3 animais cada: i) dose única de 2000 mg/kg por via intraperitoneal (ip.); ii) dose única de 300 mg/kg ip.; iii) dose única de 200 mg/kg ip.; iv) dose única de 100 mg/kg ip.; v) dose única de 50 mg/kg ip.; e, vi) dose única de água destilada ip. (grupo controle). As doses de 2000 e 300 mg/kg foram escolhidas conforme orientação da OECD (2001) para toxicidade aguda em dose única, enquanto, as demais doses foram escolhidas a fim de verificar atividade terapêutica do extrato. O extrato foi diluído em

água destilada, previamente filtrado em filtro-seringa com membrana de 0,22 µm (TPP®), e para todos os grupos o volume final da injeção foi de 0,5 mL.

4.5 Toxicidade aguda dose única do extrato aquoso da *M. ferruginata* e determinação da DL₅₀

Para determinação da toxicidade aguda dose única e DL₅₀ do extrato aquoso de *M. ferruginata*, foi seguido o guia preconizado pela ANVISA, Instrução Normativa nº 4 de 2014 (BRASIL, 2013; BRASIL, 2014b) e o *Guideline* 423 da OECD (OECD, 2001). Para este protocolo experimental, os animais tiveram acesso livre a água, mas foram privados de alimentação por duas horas antes do início do experimento e por mais duas horas após a administração do extrato. O período de observação após administração do extrato foi de 14 dias, sendo o teste de toxicidade aguda dose única avaliada segundo os parâmetros abaixo listados.

4.5.1 Screening Hipocrático

Após a administração do extrato, os animais foram avaliados cuidadosamente, por um único experimentador, cego para os grupos, a fim de se detectar sinais tóxicos nos intervalos de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas e, após diariamente até o 14º dia, por meio da avaliação das variáveis do “*Screening hipocrático*” proposto por Malone & Robichaud (1983). Os sinais avaliados na observação comportamental e exame clínico sistemático foram registrados em protocolo impresso, usando escala analógica unipolar variando de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), sendo divididos em 6 parâmetros principais, a saber: i) estado de consciência (atividade geral, frêmito vocal e irritabilidade); ii) atividade do sistema nervoso central (SNC) (tremores, convulsões, anestesia, sedação, ataxia, hipotermia, respiração e hiperemia); iii) atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) (lacrimação, cianose, ptose, salivação e piloereção); iv) atividade e coordenação do sistema motor e tonificação muscular (resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal e força para agarrar); v) reflexos (reflexo auricular, reflexo corneal, lacrimação, micção, defecação) e vi) morte.

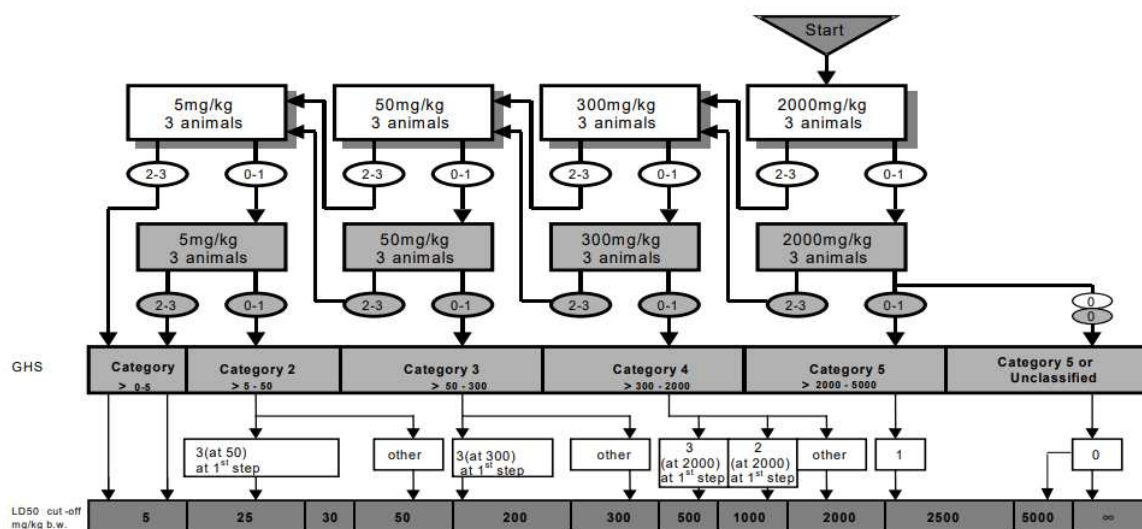
4.5.2 Avaliação ponderal e consumo de água e ração

Para o cálculo do ganho ou redução ponderal dos animais, foi realizado a pesagem em balança semi-analítica (Marte, UX420H, São Paulo - SP, Brasil), tanto antes da administração do extrato ou água (peso zero), quanto diariamente até o final dos 14 dias de exposição aos tratamentos. Além disso, foram registrados diariamente o consumo de água (em mL) e ração (em gramas) dos animais, durante todo o período experimental.

4.5.3 Determinação da DL_{50}

Para determinação da faixa da DL_{50} foi utilizado o protocolo do *Guideline* 423 da OECD (OECD, 2001), que determina o valor conforme a dose empregada do provável agente tóxico e o número de animais mortos, como apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Metodologia do ensaio de toxicidade aguda dose única, a partir da dose de 2000 mg/kg em animais de laboratório.



Legenda: GHS= Global Harmonized System; LD_{50} = dose letal mediana.

Fonte: OECD (2001).

4.5.4 Avaliação anatômica-histopatológica

No décimo quarto dia, os animais sobreviventes foram eutanasiados por meio de injeção letal de cloridrato de quetamina 300 mg/kg e xilazina 100 mg/kg, administrados por via intraperitoneal. Imediatamente após a eutanásia, foi realizada a necropsia e a análise macroscópica dos órgãos, onde foram removidos o fígado, pulmão e músculo tibial anterior para análise histológica, morfométrica e imuno-histoquímica. Após a retirada dos órgãos, os

animais foram descartados segundo as normas vigentes da UFVJM. Os órgãos removidos foram pesados em balança semi-analítica de precisão (Marte, UX420H, São Paulo - SP, Brasil) e submergidos em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após este período, os tecidos foram colocados em tampão fosfato salino (PBS) (NaCl 1,50 M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20-7,40), por 30 dias, sendo este renovado uma vez por semana, até o final do processamento histopatológico. O processamento histológico (anexo A) consistiu em desidratação em séries crescentes de álcool etílico (50-100%), diafanização em xilol, seguido de inclusão em parafina histológica (Paraplast® Leica, Germany). Os blocos de inclusão foram seccionados, em micrótomo semi-automático (Hestion, ERM 3100, Woodstock – MD, EUA), com espessura de 5,0 µm. As lâminas foram confeccionadas com 3 cortes cada, submetidos aos processos de coloração com hematoxilina e eosina (HE) e *Picrosirius Red* (anexos B e C). Após a montagem das lâminas com a resina Permount® (Fisher-SP15-500, Loughborough, England), e secagem por 48 horas, foi realizado a análise microscópica. Todas as lâminas foram fotodocumentadas em diferentes aumentos, usando microscópio óptico (Kozo, série XJS900, Nanjing, China) com câmera acoplada (Axio CAM HRc) e capturado pelo programa ToupView Help.

4.5.4.1 Análise morfológica

As análises morfológicas descritivas foram realizadas no laboratório NEA/FCBS em microscópio de luz (Kozo, série XJS900, Nanjing, China), em ensaio cego independente. As avaliações foram realizadas com objetiva de 40X de aumento, para investigação da presença de alterações reversíveis (degenerativas) e irreversíveis (necrose e apoptose), presença de células aberrantes e classificação da intensidade de infiltrado inflamatório.

4.5.4.2 Coloração com *Picrosirius Red*

Para avaliação e quantificação da fibrose tecidual foi realizada uma análise morfométrica da área de colágeno total em lâminas coradas com *Picrosirius Red*. A coloração dos cortes histológicos com *Picrosirius Red* permite a distinção das fibras de colágeno depositadas no tecido, devido ao aumento da birrefringência das fibras colágenas quando observadas em luz polarizada (WEGNER *et al.*, 2017). A intensidade de birrefringência e a cor emitida dependem do tipo de agregação física das moléculas, sendo impossível, em áreas de reparo tecidual distinguir os tipos das fibras colágenas. Dessa forma, a distinção das fibras colágenas I e III não foi possível de ser realizada, pois os animais *mdx*

apresentam espontaneamente tecido em degeneração e/ou regeneração tecidual. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio polarizado com câmera acoplada (Labomed, LX400p, Fremont – CA, EUA) a partir da delimitação do corte histológico, evitando locais com presença de artérias, arteríolas e veias que são regiões naturalmente ricas em colágeno. Foram obtidos 5 campos aleatórios de cada corte no aumento de 400X, mantendo os mesmos parâmetros de luminosidade do microscópio para todas as imagens, totalizando 15 fotomicrografias por grupo experimental. As fotomicrografias foram analisadas pelo software ImageJ, após calibração inicial da escala em micrômetros. O procedimento de análise binária (branco/preto) consistiu das etapas de: “Proces” > “Binary” > “Make Binary” > “Analyze” > “Set Measurements” > selecionado “Area’ + Area fraction” > “Analyze” > “Measure”. A quantificação do colágeno foi expressa em percentagem \pm desvio padrão de área ocupada.

4.6 Análise Imuno-histoquímica

Para as análises imuno-histoquímicas dos tecidos, foram confeccionadas lâminas previamente silanizadas contendo três cortes histológicos de 5 μ m de espessura. Em seguida, foi realizado a desparafinização em xilol seguido de re-hidratação em séries decrescentes em álcool etílico (100-70%), lavagem em água destilada e tampão citrato (ácido cítrico 2 mM e citrato trissódico 9 mM, pH 6,0) e PBS (NaCl 1,50 M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20-7,40) (anexo E). Para recuperação dos antígenos bloqueados pelo processo de fixação tecidual, as lâminas foram colocadas em tampão citrato (ácido cítrico 2 mM e citrato trissódico 9 mM, pH 6,0) e submetidos à aquecimento a 95°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas passaram por processos de lavagem com água destilada e tampão PBS (NaCl 1,50 M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20-7,40).

Para bloqueio de reações inespecíficas e da peroxidase endógena foi utilizado peróxido de hidrogênio a 3% e a Protein Block (DAKO X0909, Dako North America – CA, EUA). Após 20 minutos, as secções histológicas foram incubadas com os anticorpos primários por 20 horas a 4°C em câmara úmida, nas diluições descritas na tabela 1. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por três passagens de tampão PBS (NaCl 1,50 M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20-7,40), seguida da adição do anticorpo secundário N-Histofine (Nichirei Biosciences, Tsukiji, Tokyo) incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Ao término dessa etapa, foi realizada nova lavagem com tampão PBS (NaCl 1,50 M; Na₂HPO₄ 0,08M; NaH₂PO₄ 0,02M, pH 7,20-7,40) e revelação com o cromógeno 3,3 -diaminobenzidina (DAB) (DAKO K0679, Dako North America – CA, EUA) durante quatro minutos.

Para controle-negativo, uma das lâminas não recebeu o anticorpo primário. A coloração de fundo (contracoloração) foi realizada utilizando hematoxilina, seguida da desidratação seriada crescente em álcool etílico (70-100%), clarificação em xilol e montagem da lâmina com resina Permout® (Fisher-SP15-500, Loughborough, England). Após 48 horas de secagem, foram realizadas as fotomicrografias em microscópio óptico (Kozo, série XJS900, Nanjing, China) com câmera acoplada (Axio CAM HRc) e capturado pelo programa ToupView Help.

Tabela 1 – Relação dos anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos

Anticorpo	Clone (isotipo)	Hospedeiro	Diluição	Marca
HSP70	Monoclonal [9BRM-22]	Rato	1:500	Sigma, Saint Louis – MO, EUA
MCL-1	Monoclonal [Y37]	Coelho	1:100	Sigma, Saint Louis – MO, EUA

4.6 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão ou percentagem \pm desvio padrão e as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego – CA, EUA). Para análise da normalidade dos dados foi utilizado os testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino & Pearson. As diferenças entre as variáveis com distribuição normal foram testadas utilizando Análise de Variância (*one-way* ANOVA) com *post hoc de Bonferroni's*. Para as variáveis com distribuição assimétrica, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com *post hoc de Dunns*. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

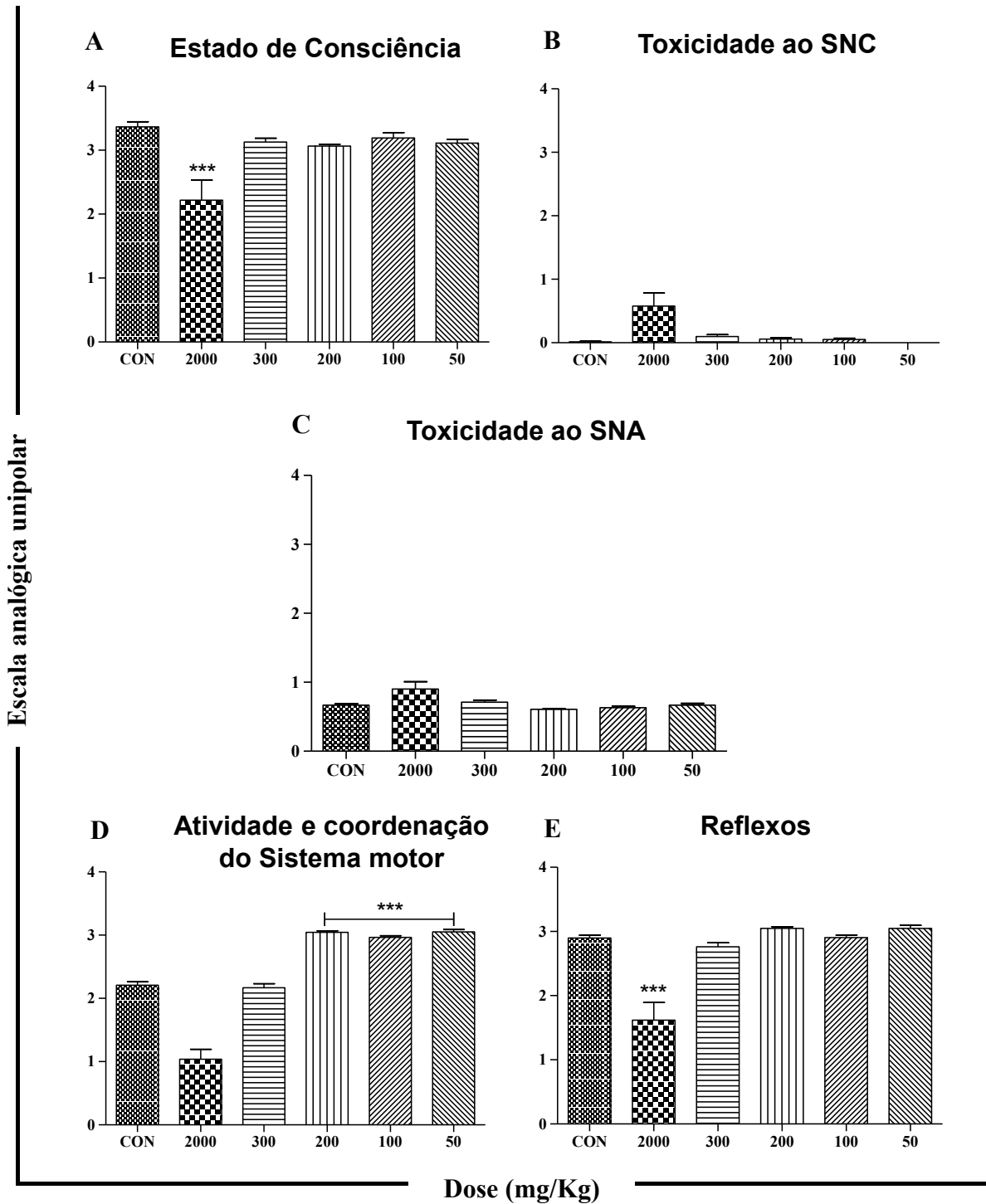
5.1 Determinação da toxicidade aguda dose única

Na avaliação da toxicidade dose única do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* em camundongos *mdx* nas doses de 2000, 300, 200, 100 e 50 mg/kg foi verificado que somente para a maior dose houve morte de todos os animais em menos de 48 horas, revelando uma elevada toxicidade do extrato nesta dose. Nas demais doses avaliadas não houve qualquer alteração comportamental ou clínica aparente.

5.1.1 *Screening* Hipocrático

Os cinco parâmetros comportamentais avaliados no *screening* hipocrático estão apresentados na figura 4. Os dados mostraram que as alterações comportamentais mais evidentes foram relacionadas ao estado de consciência, atividade e coordenação do sistema motor e reflexos, sendo que somente para a dose de 2000 mg/kg foi observado alterações significativas ($p < 0,001$) nesses parâmetros. Inicialmente os animais que receberam essa dosagem apresentaram maior irritabilidade, agitação, aumento do frêmito vocal e desorientação (andavam em círculos). Mas com cerca de 8 horas de observação ocorreu uma inversão comportamental, onde os animais se apresentavam mais letárgicos, paralisados, sem nenhuma resposta ao toque e reflexos córnea e auricular ausentes. Esse comportamento letárgico permaneceu até a morte desses animais, onde um animal morreu com 12 horas, outro com 24 horas e o terceiro com 48 horas após administração do extrato. Em relação aos outros parâmetros avaliados, não foram observadas alterações estatisticamente significativas. Entretanto, com relação ao SNC foi observado que para a dosagem de 2000 mg/kg os animais apresentaram, após 8 horas da administração, uma leve sedação e redução da frequência respiratória. Desta forma, os resultados comportamentais sugerem que o extrato apresenta uma alta toxicidade na dosagem de 2000 mg/kg e nenhuma toxicidade nas outras dosagens avaliadas.

Figura 4 – Screening hipocrático da avaliação comportamental dos animais submetidos ao tratamento em dose única do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.

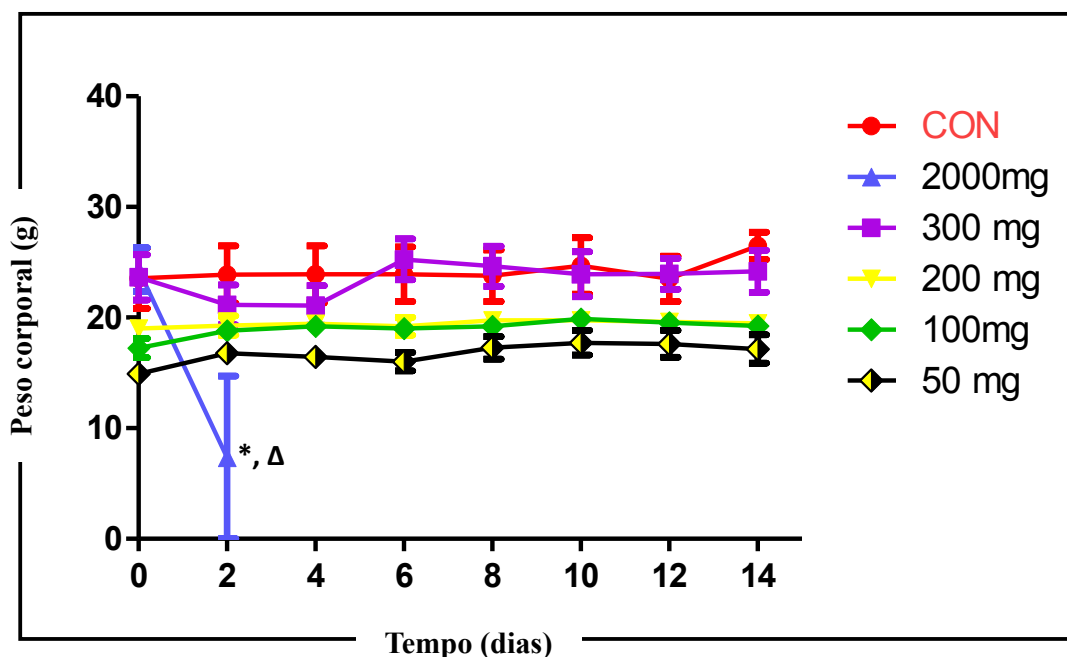


Teste ANOVA, *Post hoc de Dunns*, *** $p < 0,001$.

5.1.2 Avaliação ponderal

Os resultados obtidos na dose de 2000 mg/kg demonstraram que o extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* administrado, interferiu no desenvolvimento ponderal dos animais, uma vez que, durante o curto período de sobrevivência os animais não se alimentaram e observou-se uma curva decrescente no peso. Enquanto, para as outras dosagens avaliadas do extrato, não ocorreu nenhuma alteração no desenvolvimento ponderal nos 14 dias de observação pós-tratamento (Figura 5).

Figura 5 – Avaliação do desenvolvimento ponderal dos animais tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.

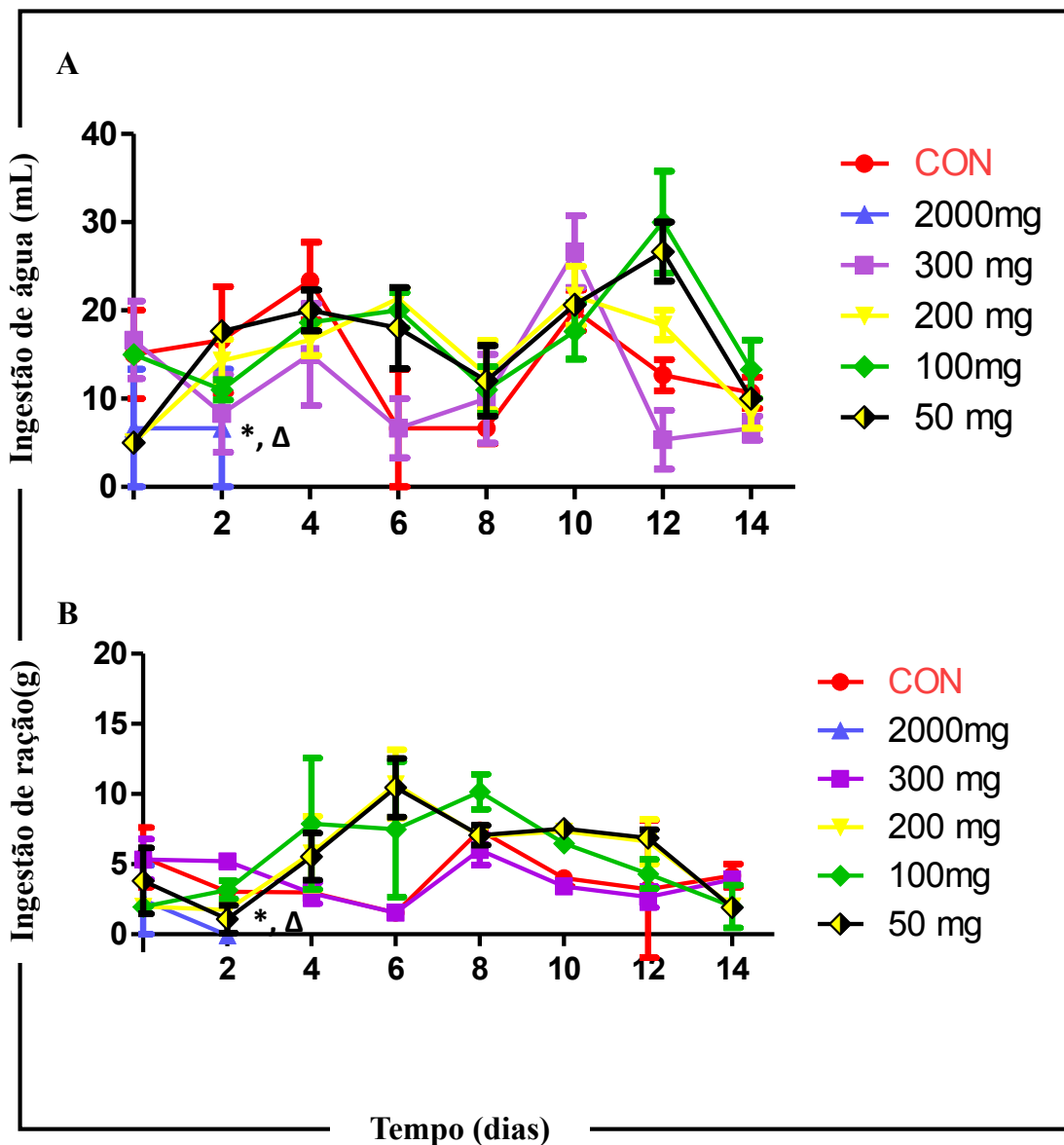


Teste ANOVA, *post hoc* de Dunns, $*p < 0,001$; Δ = morte dos animais.

5.1.3 Avaliação do consumo de água e ração

Na avaliação do consumo de água (mL) e ração (gramas) apenas para os animais que receberam a dose de 2000mg/kg houve uma redução significativa do consumo em relação ao grupo controle, uma vez que houve morte de todos os animais deste grupo. Para as demais dosagens não foi observado nenhuma diferença entre o consumo tanto de água quanto de ração durante todo o período experimental.

Figura 6 – Avaliação do consumo de água e ração dos animais tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.



Teste ANOVA, *post hoc* de Dunns, * $p < 0,001$; Δ = morte dos animais.

5.1.4 Determinação da DL₅₀

O extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* foi considerado tóxico de acordo com o método de classes preconizado pela OECD 423 (OECD, 2001), sendo classificado na categoria 4 do *Globally Harmonised System* (GHS), pois apresentou uma faixa de segurança moderada, entre >300 e <2000 mg/kg (Figura 3). Assim, segundo essa classificação a DL₅₀ foi estimada em 1000 mg/kg.

5.1.5 Avaliação morfológica (macroscópica e microscópica)

A relação dos valores de média \pm desvio padrão dos pesos dos órgãos dos animais tratados com extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* analisados nesta pesquisa está apresentado na tabela 2. Apenas no pulmão houve uma diferença significativa no peso do órgão para a dosagem de 2000 mg/kg em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$), para o fígado apesar da ausência de diferença significativa de peso do órgão, visualmente este se apresentava com aumento discreto de tamanho (hepatomegalia leve).

Tabela 2 – Média e desvio padrão do peso dos órgãos dos animais tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.

Grupos	Órgãos		
	Pulmão	Fígado	Músculo Tibial
Controle	0,104 \pm 0,014	1,130 \pm 0,294	0,041 \pm 0,005
2000 mg/mL	0,297 \pm 0,168*	0,976 \pm 0,100	0,037 \pm 0,013
300 mg/mL	0,053 \pm 0,012	1,364 \pm 0,326	0,030 \pm 0,005
200 mg/mL	0,152 \pm 0,008	1,206 \pm 0,212	0,037 \pm 0,004
100 mg/mL	0,100 \pm 0,073	1,287 \pm 0,044	0,032 \pm 0,009
50 mg/mL	0,127 \pm 0,011	1,108 \pm 0,129	0,030 \pm 0,012

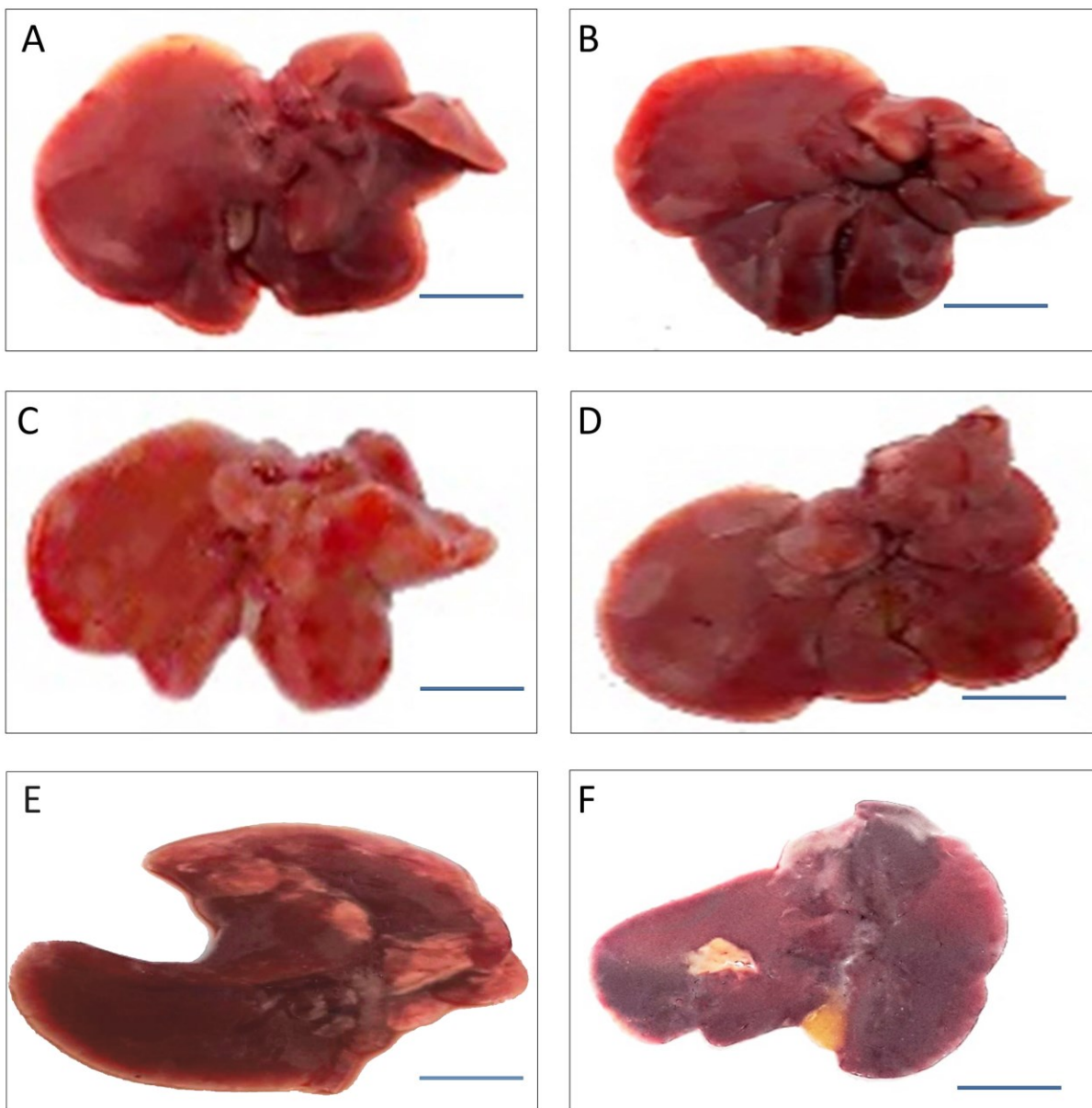
Teste ANOVA, *post hoc de Dunns*, * $p < 0,01$.

5.1.5.1 Análise macroscópica

a) Fígado

Macroscopicamente, o fígado dos animais tratados com extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* na dose de 2000 mg/kg apresentavam discreta hepatomegalia (maior distensão), edema e coloração enegrecida, como observado na figura 7. Para os animais tratados com a dose de 300 mg/kg também foi observado edema e hepatomegalia, porém de grau leve, bem como a coloração do órgão estava mais escura, quando comparado com o grupo controle. Enquanto, para as demais dosagens avaliadas (200, 100 e 50 mg/kg) foi observado que os órgãos não apresentavam nenhuma alteração de tamanho, distensão e/ou coloração, quando comparado ao grupo controle.

Figura 7 – Análise macroscópica do fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



Legenda: A – Fígado do animal do grupo controle; B - Fígado do animal tratado com 50 mg kg⁻¹; C - Fígado do animal tratado com 100 mg kg⁻¹; D - Fígado do animal tratado com 200 mg kg⁻¹; E - Fígado do animal tratado com 300 mg kg⁻¹; F - Fígado do animal tratado com 2000 mg kg⁻¹. Barra: 1cm.

b) Pulmão

O pulmão dos animais tratados com extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* na dose de 2000 mg/kg, macroscopicamente foi observado grande distensão do tecido, alteração na coloração, pleura gravemente deformada com vários coágulos sanguíneos adjacentes e colapamento do diafragma. Enquanto, para os animais tratados com a dose

de 300 mg/kg observou-se também uma alteração na coloração e deformação pleural, mas em grau mais leve quando comparado com os animais tratados com a dose de 2000 mg/kg. Além disso, foi observado uma redução do número de coágulos adjacentes a pleura, bem como ausência de colapamento do diafragma. Para os animais tratados com as doses de 200, 100 e 50 mg/kg não foi observado nenhuma alteração macroscópica tecidual.

c) Músculo Tibial anterior

Para o musculo tibial anterior não foram observadas alterações macroscópicas teciduais em nenhum animal tratado com as diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*.

5.1.5.2 Análise microscópica

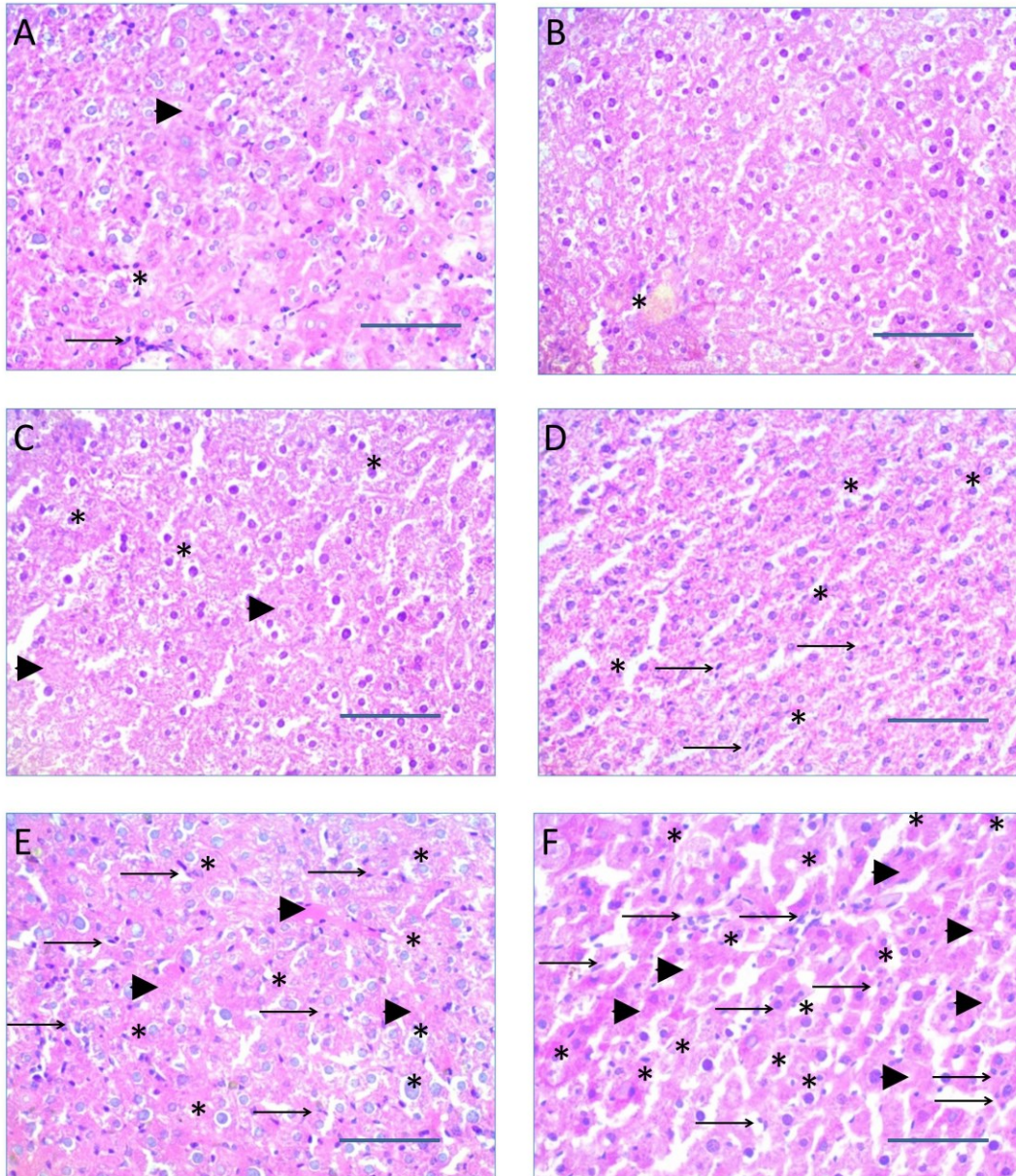
a) Fígado

A figura 8 apresenta as fotomicrografias do fígado para as diferentes dosagens administradas intraperitonealmente do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*. Na análise microscópica foi observado que o grupo controle apresenta pequenas lesões com presença de infiltrado inflamatório, degeneração hidrópica leve e poucas células em apoptose e necrose, como esperado para os animais *mdx*. Já para os animais tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*, mostrou exacerbações das lesões com uma área extensa de degeneração hidrópica, inúmeras fissuras ao redor dos hepatócitos e hipertrofia das células de *Kupffer*. Grande parte dos hepatócitos apresentavam binucleação ou núcleos hiperocrômicos e eosinofilia citoplasmática, sugestivo de processo de toxicidade celular. Também foi observada presença de áreas claras nos hepatócitos, sugestivo da presença de infiltração gordurosa.

Para o fígado dos animais tratados com o extrato nas dosagens de 300, 200 e 100 mg/kg foi observada uma diminuição das lesões celulares com regeneração tecidual, redução das degenerações hidrópicas, diminuição das fissuras e da hipertrofia dos hepatócitos e células de *Kupffer*. O tecido, de forma geral, apresentou melhora e redução do infiltrado inflamatório e necrose tecidual. Impressionantemente, a dose de 50 mg/kg do extrato revelou uma regeneração tecidual completa com redução drástica da degeneração hidrópica, infiltrado inflamatório e hipertrofia celular, quando comparado ao grupo controle. Desta forma, o

extrato de *M. ferruginata* nesta dose mostrou ter um possível efeito anti-inflamatório e de regeneração hepática.

Figura 8 – Análise histológica do fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.

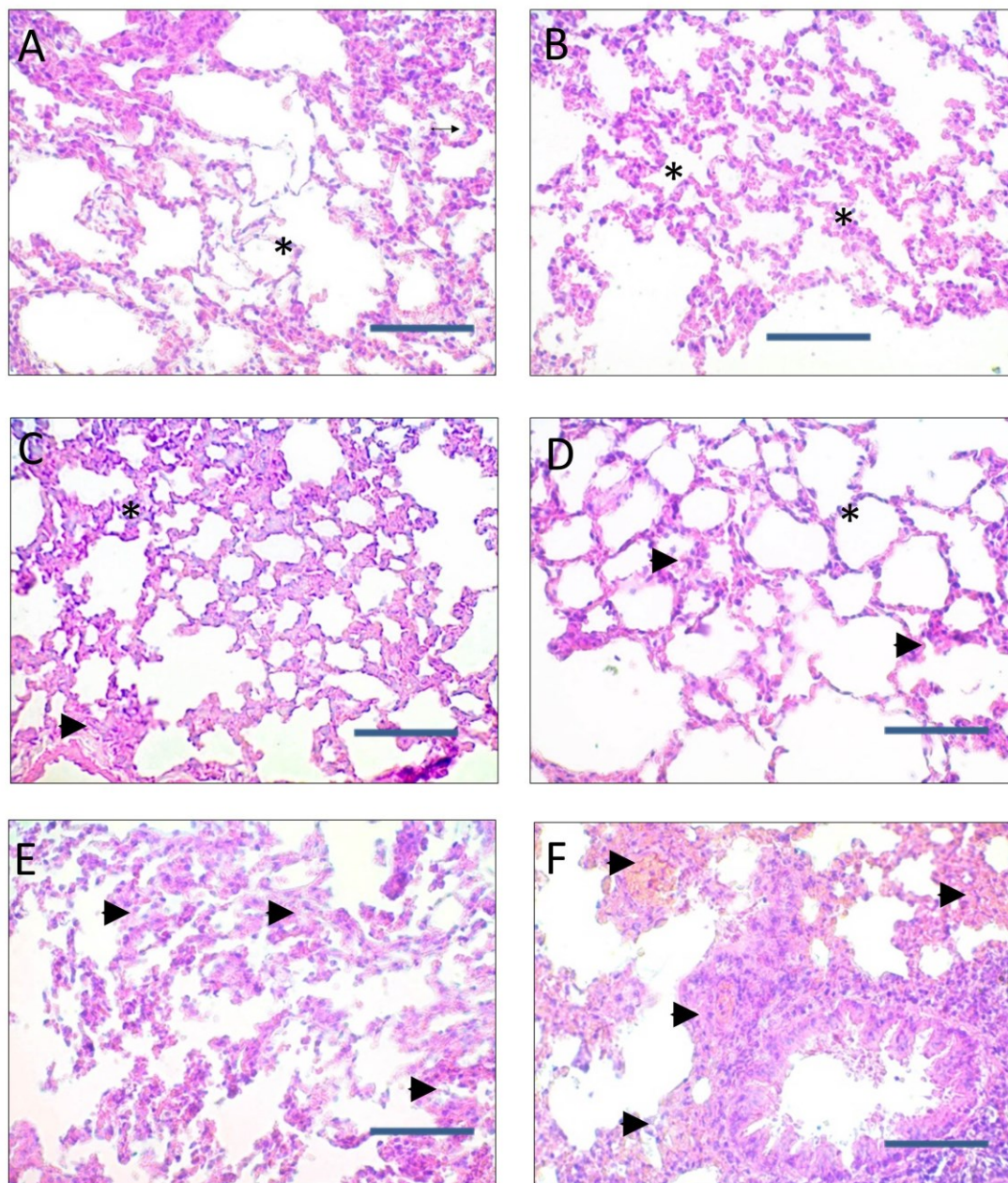


Legenda: A - Fígado do animal do grupo controle; B - Fígado do animal tratado com 50 mg kg⁻¹; C - Fígado do animal tratado com 100 mg kg⁻¹; D - Fígado do animal tratado com 200 mg kg⁻¹; E - Fígado do animal tratado com 300 mg kg⁻¹; F - Fígado do animal tratado com 2000 mg kg⁻¹. HE - 40X. Barra: 400 µm. As setas correspondem a infiltrado inflamatório. As pontas das setas correspondem a necroses. Asteriscos correspondem a apoptose.

b) Pulmão

As fotomicrografias do pulmão para as diferentes dosagens administradas intraperitonealmente do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* estão apresentados na figura 9. Microscopicamente, no grupo controle foi observada congestão pulmonar leve com presença de infiltrado inflamatório discreto. Já para o pulmão dos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*, mostrou uma congestão pulmonar grave com presença de infiltrado inflamatório denso, pleura e alvéolos severamente degradados com comprometimento da função pulmonar, corroborando com o achado de aumento do peso observado neste órgão. Nas doses de 300, 200 e 100 mg/kg foi observado uma melhora da congestão e perfil pulmonar e pleural com redução do infiltrado inflamatório. Como observado no fígado, também no pulmão a dose de 50 mg/kg mostrou uma restauração pulmonar significativa, com redução drástica do infiltrado inflamatório, congestão pulmonar e restauração da pleura.

Figura 9 – Análise histológica do pulmão de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.



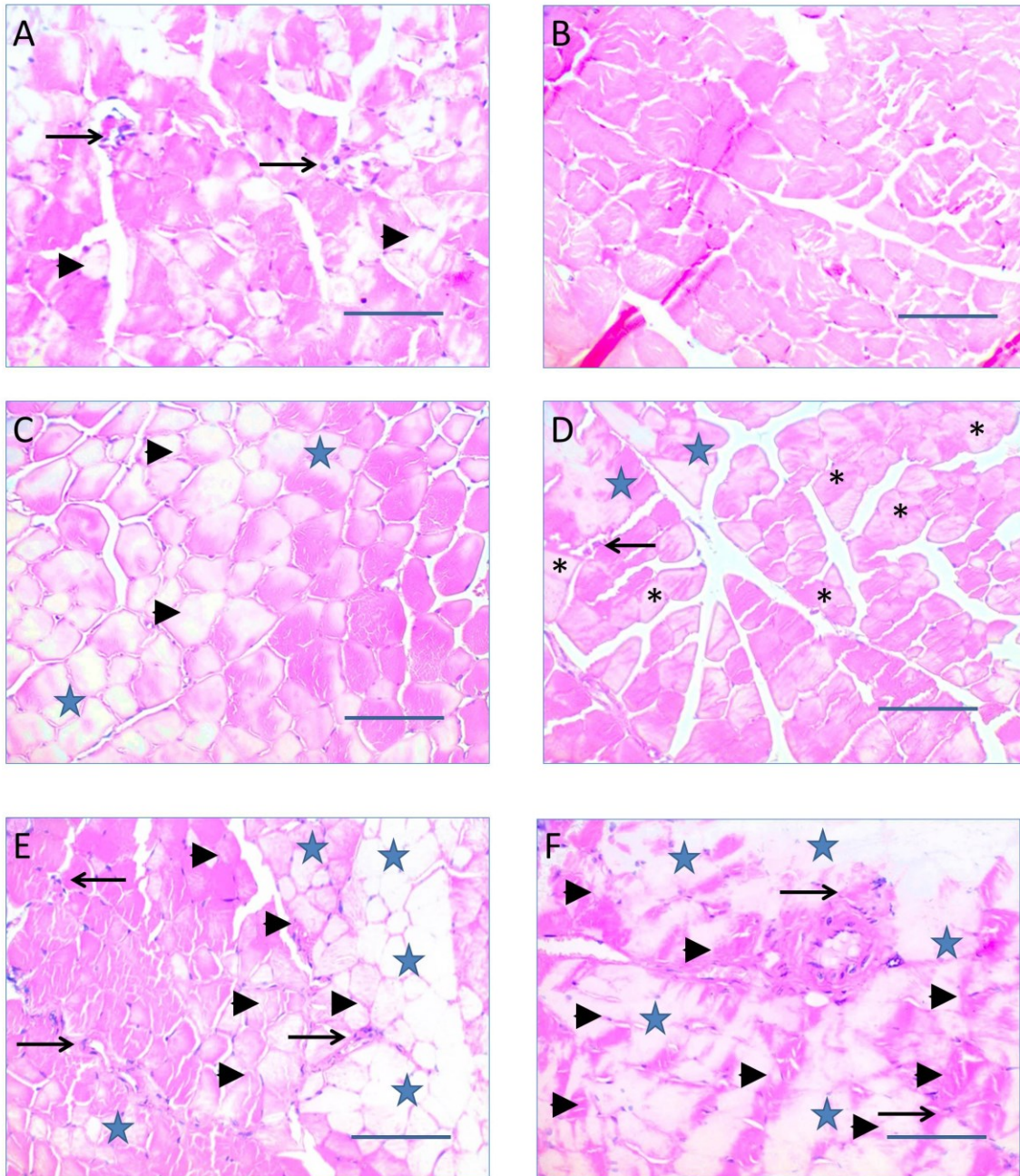
Legenda: A – Pulmão do animal do grupo controle; B – Pulmão do animal tratado com 50 mg kg⁻¹; C - Pulmão do animal tratado com 100 mg kg⁻¹; D - Pulmão do animal tratado com 200 mg kg⁻¹; E - Pulmão do animal tratado com 300 mg kg⁻¹; F - Pulmão do animal tratado com 2000 mg kg⁻¹. HE - 400X. Barra: 400 µm. As pontas das setas correspondem a necroses. Asteriscos correspondem a apoptose.

c) Músculo Tibial anterior

As fotomicrografias do músculo tibial direito para as diferentes dosagens administradas intraperitonealmente do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* está

apresentado na figura 10. No grupo controle foi observado moderado nível de lesões teciduais, rico em infiltrado inflamatório, degeneração hidrópica e células em apoptose e necrose. Como para os outros tecidos descritos, os animais que foram tratados com a dose de 2000 mg/kg mostraram aumento das lesões musculares, elevada degeneração hidrópica com inúmeras fissuras e infiltrado inflamatório denso. Também apresentaram maior número de áreas necróticas e células em processo de apoptose. Para os animais tratados com as doses de 300, 200 e 100 mg/kg do extrato, houve uma redução dose-dependente das degenerações hidrópicas, fissuras e áreas de necrose e apoptose. Já para a dose de 50 mg/kg, houve uma melhora considerável do quadro de degeneração, característico da DMD, onde foi observado redução significativa da degeneração hidrópica e infiltrado inflamatório, bem como ausência de áreas necróticas e poucas células em processo de apoptose. Frente a esses resultados, pode-se sugerir que o extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* atua na regeneração muscular e redução do processo inflamatório.

Figura 10 – Análise histológica do músculo tibial anterior de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.

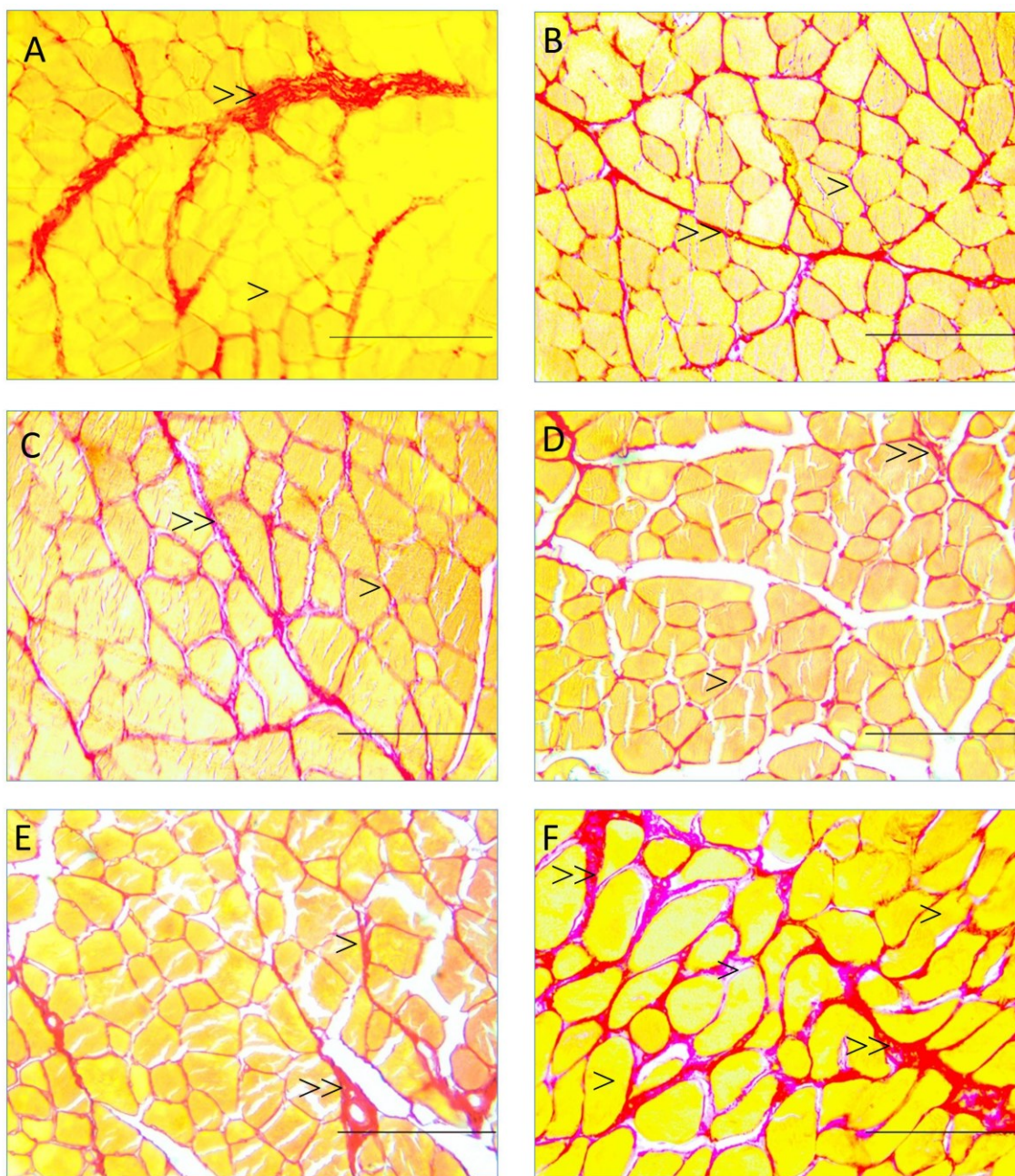


Legenda: A – Músculo Tibial anterior do animal do grupo controle; B - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 50 mg kg⁻¹; C - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 100 mg kg⁻¹; D - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 200 mg kg⁻¹; E - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 300 mg kg⁻¹; F - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 2000 mg kg⁻¹. HE - 400X. Barra: 400 μm. As setas correspondem a infiltrado inflamatório. As pontas das setas correspondem a necroses. Asteriscos correspondem a apoptose.

5.1.6 Descrição morfológica e quantificação da fibrose pela coloração de *Picrossilius red*

Em análise morfológica, o músculo tibial dos animais distróficos (grupo controle) apresentou características histopatológicas típicas da DMD. Neste grupo foi observado distribuição heterogênea das fibras de colágeno entre as fibras musculares, onde no perimísio houve predominância de feixes espessos, enquanto no endomísio presença de feixes delgados. O extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*, mostrou melhora na distribuição das fibras colágenas sobre as musculares, sendo que na dose de 50 mg/kg esse perfil de distribuição se apresentou uniforme e homogêneo, recobrando maiores áreas musculares. Na figura 11 são apresentadas as fotomicrografias do tecido muscular (tibial anterior direito) coradas com *Picrossilius red*, coloração que evidencia as fibras de colágeno, dos diferentes grupos experimentais avaliados.

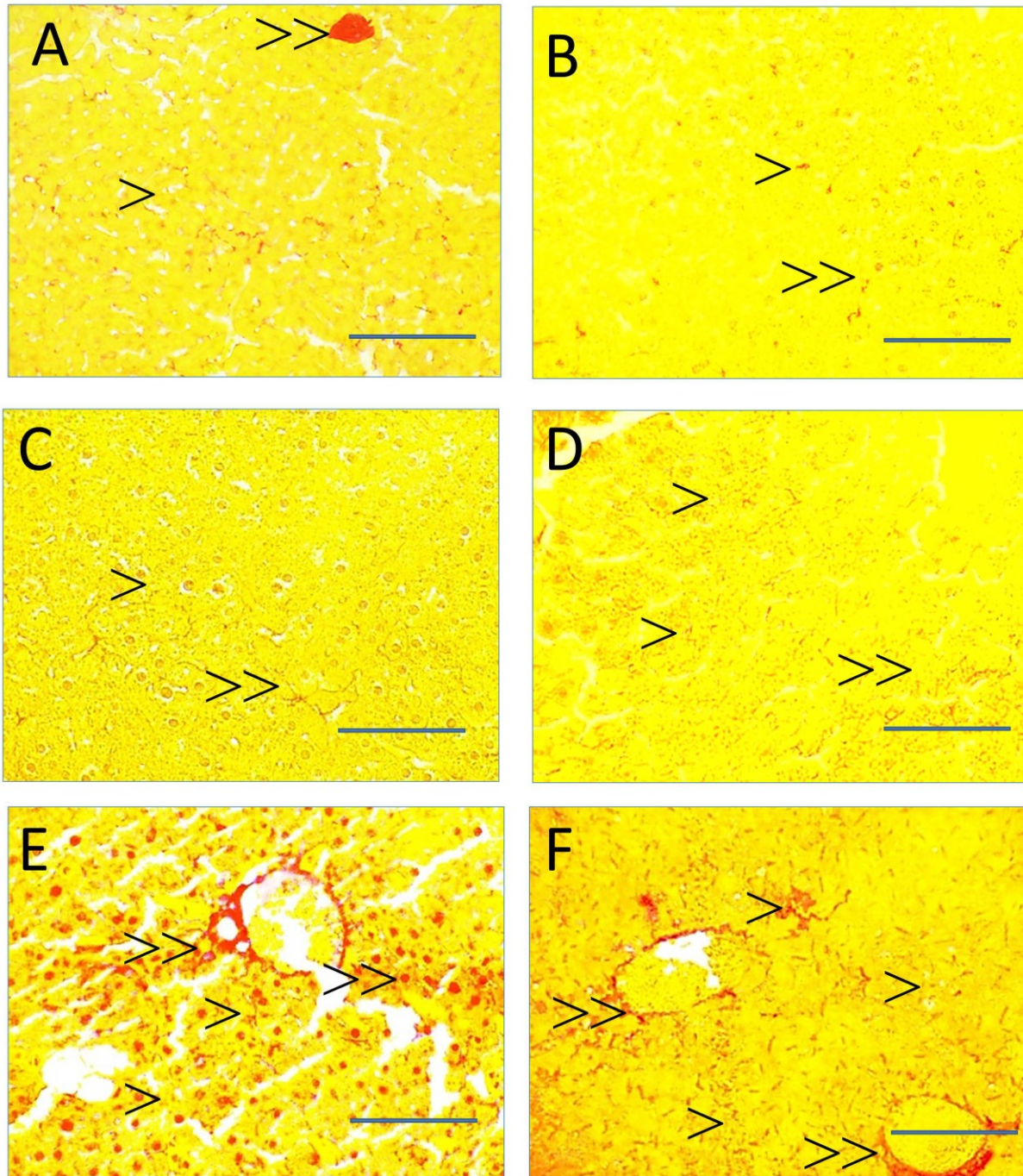
Figura 11- Análise da distribuição de fibras colágenas no músculo tibial anterior de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



Legenda: A - Músculo Tibial anterior do animal do grupo controle; B - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 50 mg kg⁻¹; C - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 100 mg kg⁻¹; D - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 200 mg kg⁻¹; E - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 300 mg kg⁻¹; F - Músculo Tibial anterior do animal tratado com 2000 mg kg⁻¹. Coloração *Picrosirius Red* (400X). Barra: 400 μ m. >> Deposição de fibras de colágeno no perimísio; > Deposição de fibras de colágeno no endomísio.

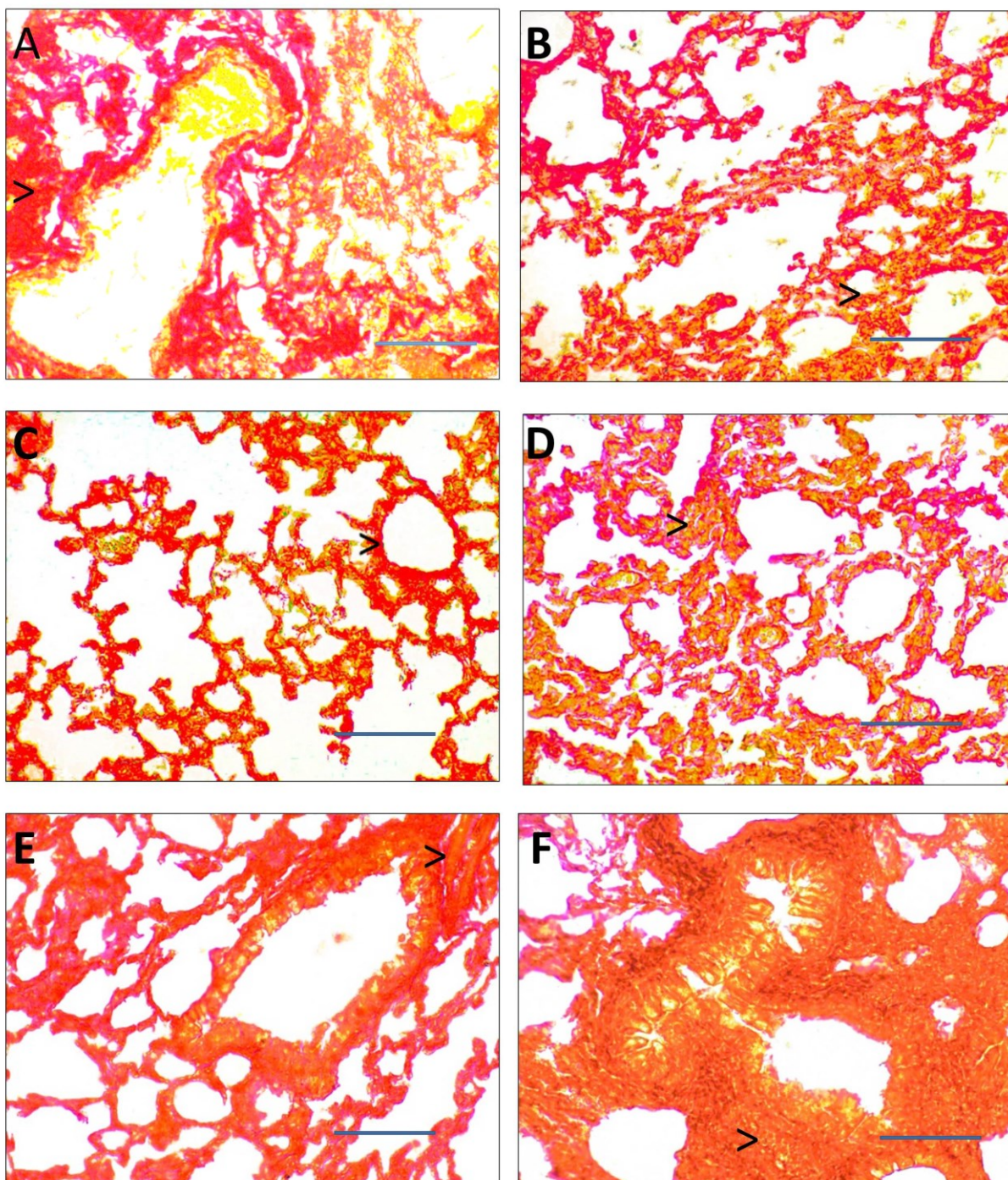
Tanto para o fígado (Figura 12) quanto para o pulmão (Figura 13), a análise morfológica tecidual revelou características histopatológicas semelhantes para as diferentes dosagens avaliadas. Assim, nas dosagens de 2000 e 300 mg/kg foram observadas áreas de fibrose semelhante ou aumentadas, quando comparado ao grupo controle. Enquanto, nas dosagens de 200 e 100 mg/kg houve uma redução moderada das áreas de fibrose, indicando uma possível regeneração tecidual. Mas o resultado surpreendente foi observado nos animais tratados com a dose de 50 mg/kg do extrato. Nesse grupo, houve uma regressão da fibrose e restauração morfofuncional dos tecidos, sugerindo um possível efeito de reversão da fibrose tecidual.

Figura 12- Análise da distribuição das fibras colágenas no fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



Legenda: A – Fígado do animal do rupo controle; B - Fígado do animal tratado com 50 mg kg⁻¹; C - Fígado do animal tratado com 100 mg kg⁻¹; D - Fígado do animal tratado com 200 mg kg⁻¹; E - Fígado do animal tratado com 300 mg kg⁻¹; F - Fígado do animal tratado com 2000 mg kg⁻¹. Coloração *Picrossirius Red* (400X). Barra: 400 µm. >> Deposição interlobular de fibras de colágeno; > Deposição intralobular de fibras de colágeno.

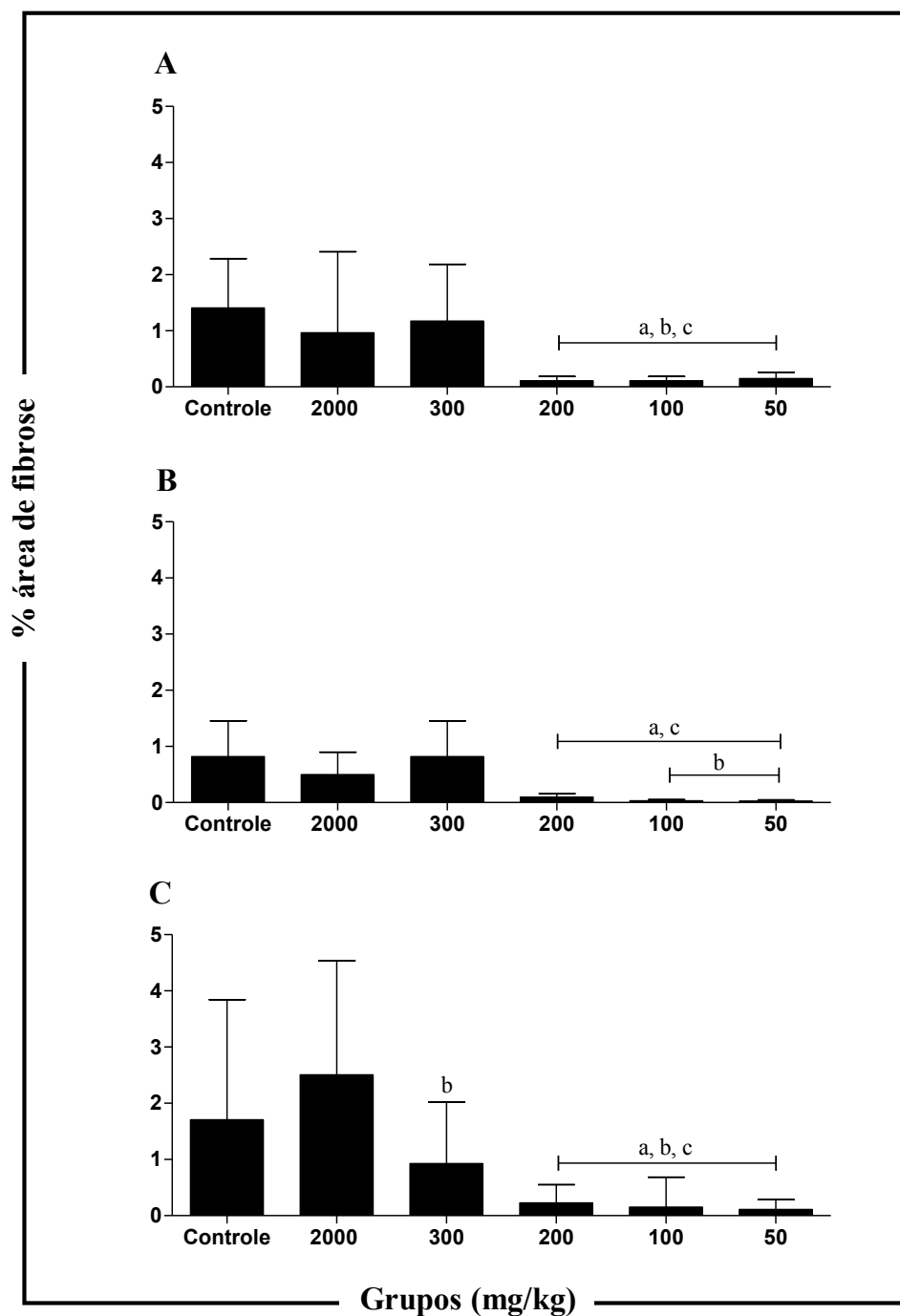
Figura 13 - Análise da distribuição das fibras colágenas no pulmão de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



Legenda: A – Pulmão do animal do grupo controle; B - Pulmão do animal tratado com 50 mg kg^{-1} ; C - Pulmão do animal tratado com 100 mg kg^{-1} ; D - Pulmão do animal tratado com 200 mg kg^{-1} ; E - Pulmão do animal tratado com 300 mg kg^{-1} ; F - Pulmão do animal tratado com 2000 mg kg^{-1} . Coloração *Picrosirius Red* (400X). Barra: $400 \mu\text{m}$; > Deposição de fibras colágenas no parênquima pulmonar.

A quantificação percentual média da área de fibrose avaliada nos diferentes órgãos se encontra na figura 14. É possível perceber que houve uma semelhança de deposição de fibras colágenas nos diferentes órgãos. De modo geral, os animais tratados com extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*, nas doses de 200, 100 e 50 mg/kg apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) da deposição de colágeno e, conseqüente menor fibrose tecidual. Tanto o tecido do fígado quanto do pulmão, os animais tratados com extrato nas doses de 2000 e 300 mg/kg apresentaram perfil de deposição de colágeno semelhante ao grupo controle, mostrando que nessas doses não houve interferência do extrato nos mecanismos da fibrose. Porém, para as doses de 200, 100 e 50 mg/kg houve uma redução considerável da fibrose, tanto no fígado quanto no pulmão. Diferentemente, para músculo tibial anterior a dose de 2000 mg/kg mostrou um aumento da deposição de colágeno, mas não significativo (CON: $1,70 \pm 2,13$; 2000 mg/kg: $2,50 \pm 2,02$), enquanto, as doses de 300, 200, 100 e 50 mg/kg apresentaram uma redução da deposição de colágeno significativa e de forma dose-dependente (CON: $1,70 \pm 2,13$; 300 mg/kg: $0,92 \pm 1,09$; 200 mg/kg: $0,22 \pm 0,32$; 100 mg/kg: $0,15 \pm 0,53$; 50 mg/kg: $0,11 \pm 0,17$).

Figura 14 – Quantificação percentual da área de fibrose em diferentes órgãos dos camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Miconia ferruginata*.

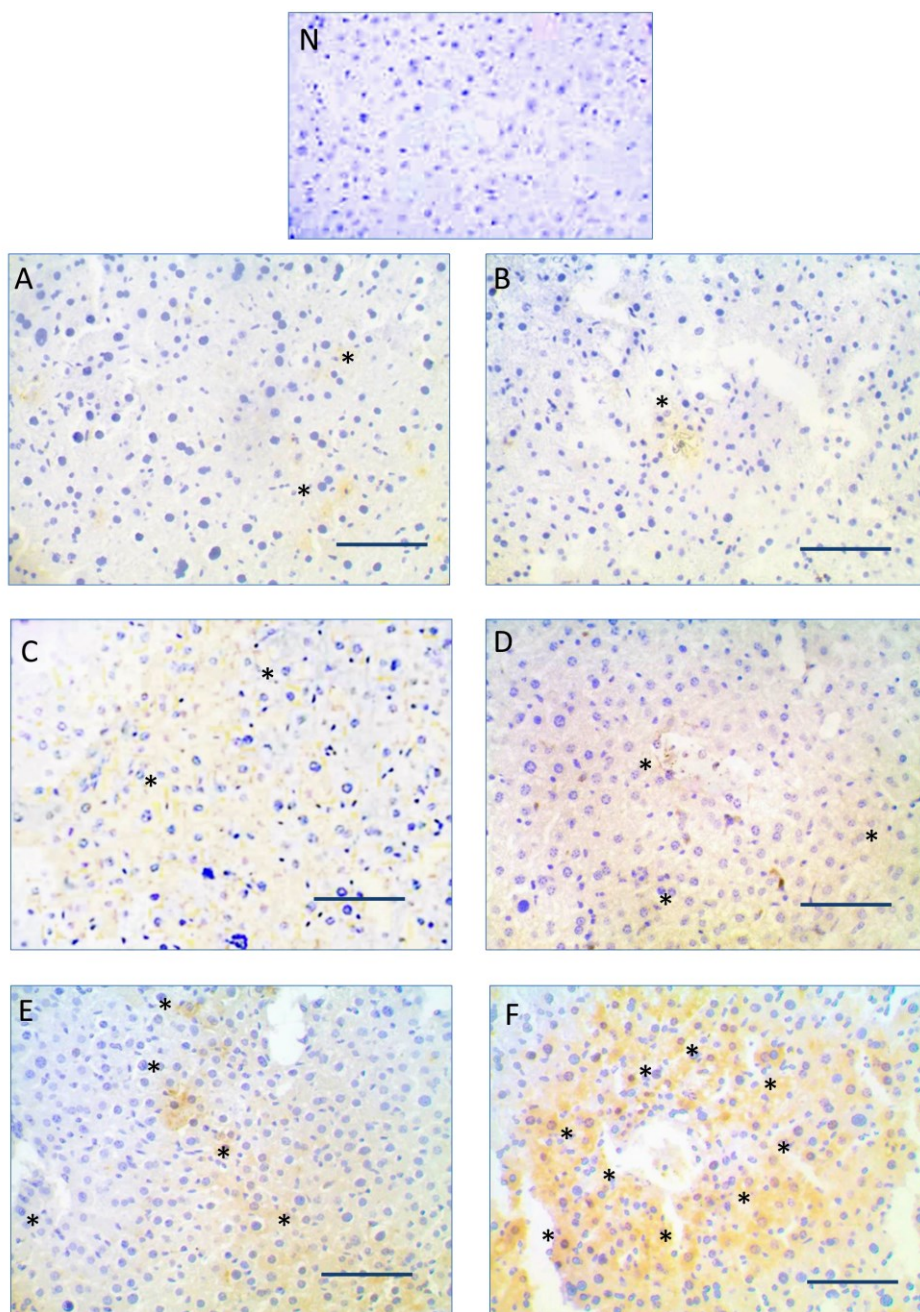


Legenda: A – Tecido do Fígado; B – Tecido do Pulmão; C – Tecido do Músculo Tibial anterior. Teste ANOVA, *post hoc de Dunns*, $p < 0,001$. a: diferença estatística em relação ao grupo controle; b: diferença estatística em relação ao grupo da dose de 2000 mg/kg; c: diferença estatística em relação ao grupo da dose de 300 mg/kg.

5.7 Avaliação Imuno-histoquímica dos marcadores de estresse e apoptose (HSP70 e MCL-1)

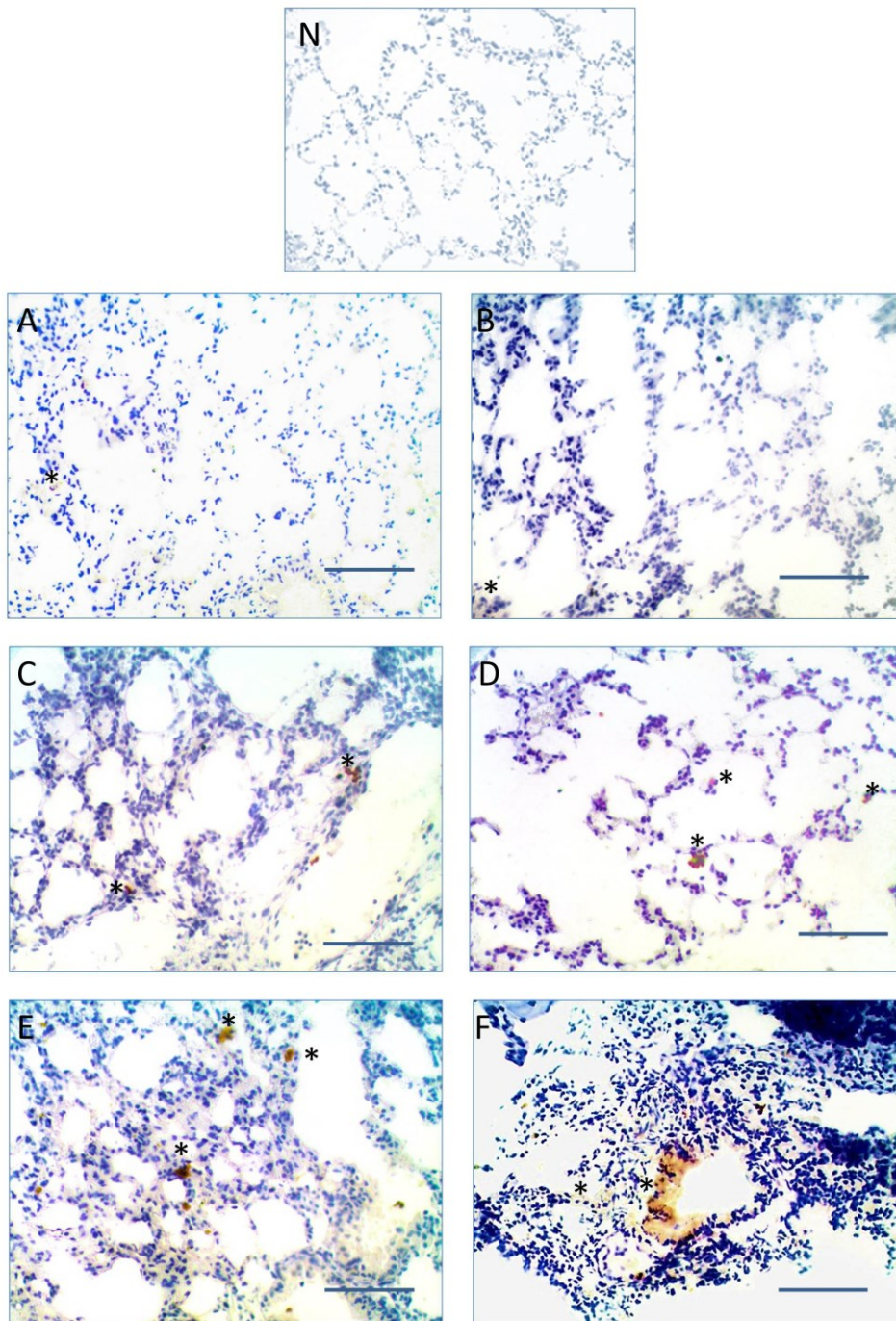
Na análise imuno-histoquímica das proteínas HSP70 e MCL-1 foi observado sua imunolocalização na região citoplasmática das células, nos diferentes tecidos avaliados. Para a marcação da HSP70, proteína relacionada ao nível de estresse celular, houve um aumento da expressão no tecido do fígado (Figura 15), pulmão (Figura 16) e músculo tibial (Figura 17) dos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato, mostrando que neste grupo houve um aumento do estresse celular. Já para a marcação com MCL-1, proteína antiapoptótica, foi realizada somente para o tecido do fígado, neste órgão foi observado uma redução da expressão desta proteína (Figura 18), nos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg do extrato. Esses dados, juntamente com as observações clínicas, histológicas e morfométricas, evidenciam a elevada toxicidade da dose de 2000 mg/kg do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*. Para os animais tratados com as outras doses (300, 200, 100 e 50 mg/kg) foi observada uma redução dose-dependente do marcador de estresse celular avaliado (HSP70) em todos os tecidos e aumento da expressão da proteína antiapoptótica (MCL-1) no fígado, quando comparado com o grupo controle. Cabe destacar que para a dose de 50 mg/kg a redução da HSP70 e aumento da MCL-1 superou o grupo controle.

Figura 15 - Análise imuno-histoquímica anti-HSP70 no tecido do fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



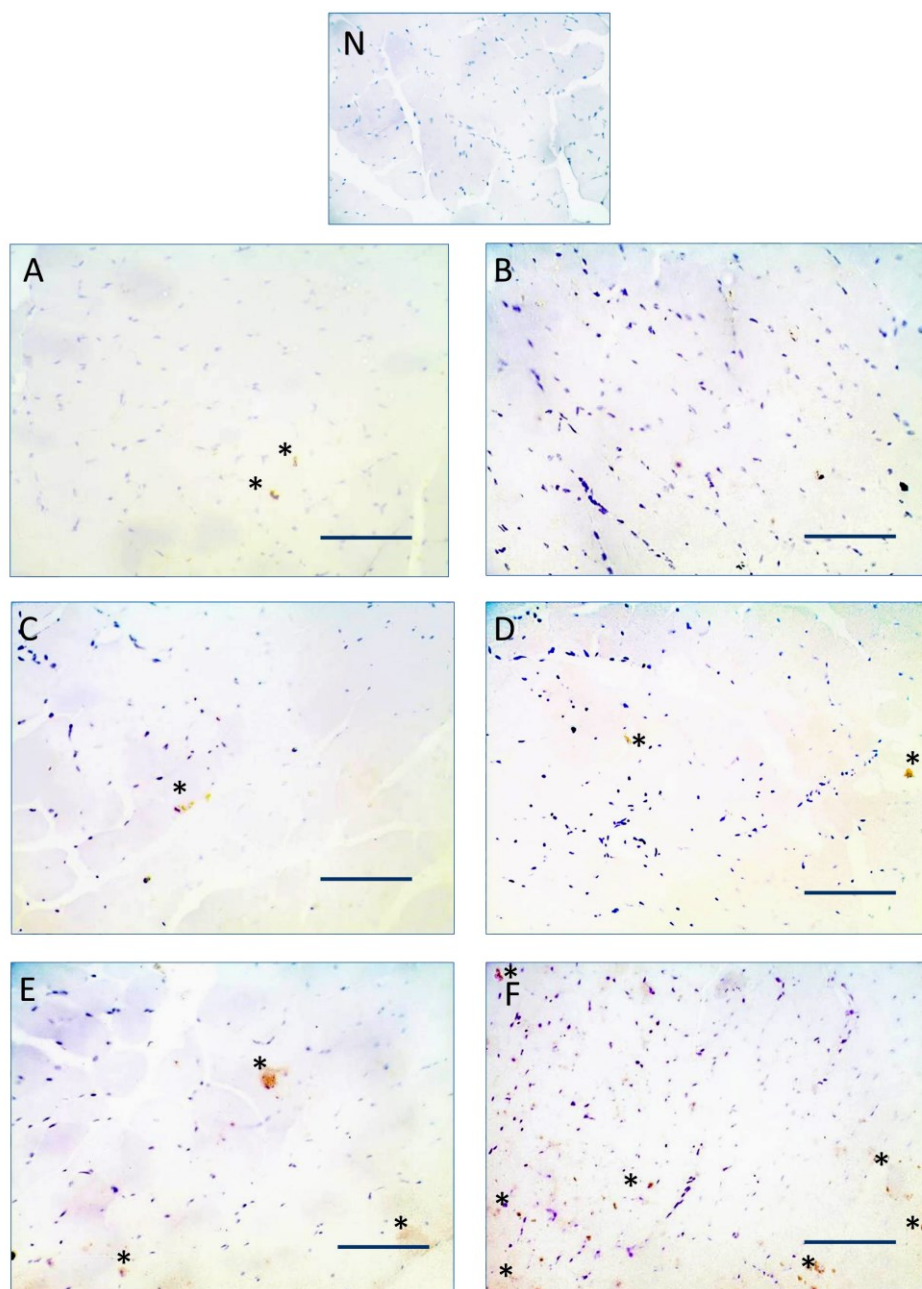
Legenda: N - Controle negativo da reação. A – Fígado do animal do grupo controle; B - Fígado do animal tratado com 50 mg kg^{-1} ; C - Fígado do animal tratado com 100 mg kg^{-1} ; D - Fígado do animal tratado com 200 mg kg^{-1} ; E - Fígado do animal tratado com 300 mg kg^{-1} ; F - Fígado do animal tratado com 2000 mg kg^{-1} . (400X). Barra: $400 \mu\text{m}$. Os asteriscos nas figuras mostram a expressão da proteína anti-HSP70, em diferentes dosagens com a planta *Miconia ferruginata*.

Figura 16 - Análise imuno-histoquímica anti-HSP70 no tecido do pulmão de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



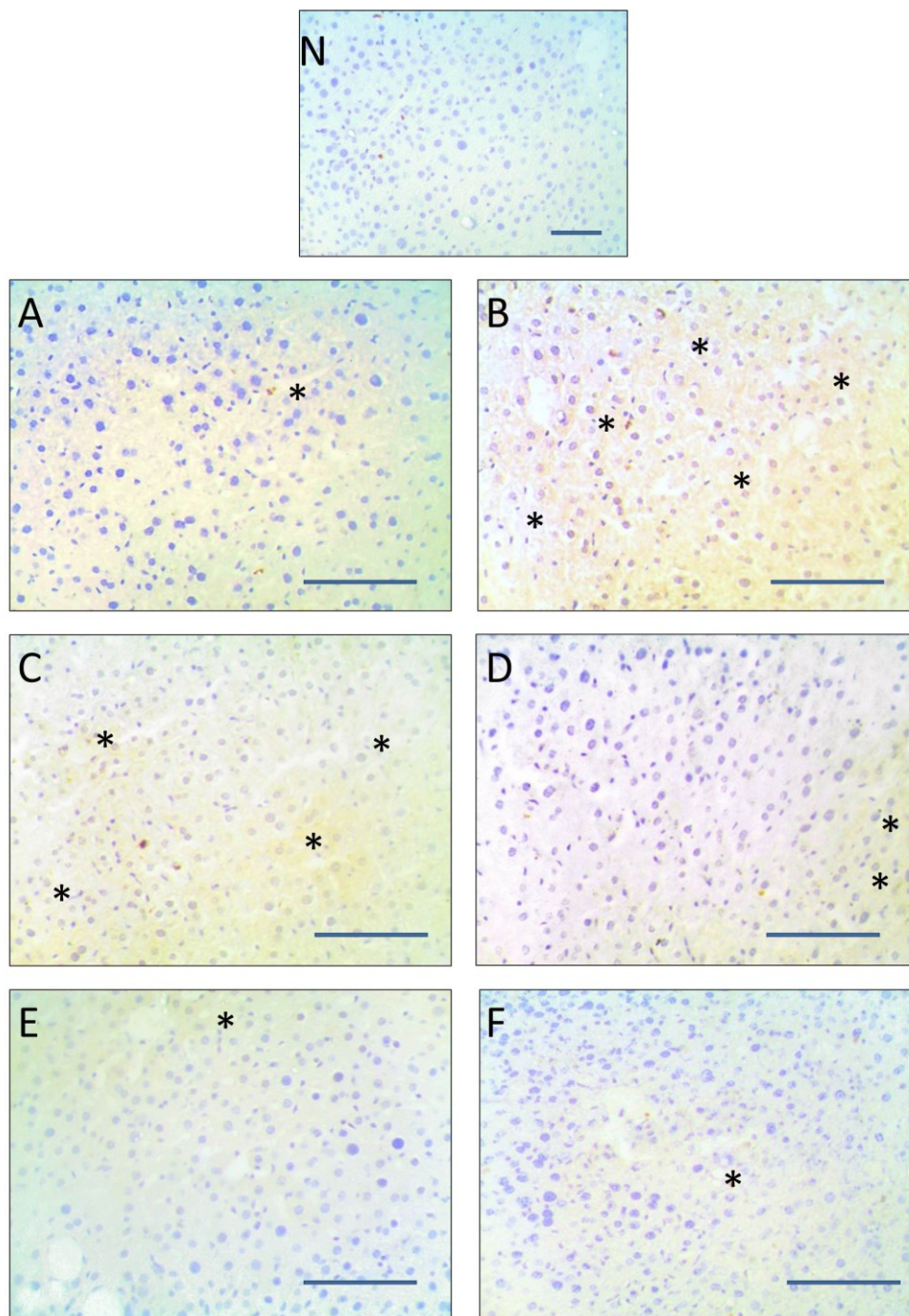
Legenda: N - Controle negativo da reação; A – Pulmão do animal do grupo controle; B - Pulmão do animal tratado com 50 mg kg^{-1} ; C - Pulmão do animal tratado com 100 mg kg^{-1} ; D - Pulmão do animal tratado com 200 mg kg^{-1} ; E - Pulmão do animal tratado com 300 mg kg^{-1} ; F - Pulmão do animal tratado com 2000 mg kg^{-1} . (400X). Barra: $400 \mu\text{m}$. Os asteriscos nas figuras mostram a expressão da proteína anti-HSP70, em diferentes dosagens com a planta *Miconia ferruginata*.

Figura 17 - Análise imuno-histoquímica anti-HSP70 no tecido do músculo tibial direito de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



Legenda: N - Controle negativo de reação; A - Músculo Tibial anterior de animal do grupo controle; B - Músculo Tibial anterior de animal tratado com 50 mg kg^{-1} ; C - Músculo Tibial anterior de animal tratado com 100 mg kg^{-1} ; D - Músculo Tibial anterior de animal tratado com 200 mg kg^{-1} ; E - Músculo Tibial anterior de animal tratado com 300 mg kg^{-1} ; F - Músculo Tibial anterior de animal tratado com 2000 mg kg^{-1} . (400X). Barra: $400 \mu\text{m}$. Os asteriscos nas figuras mostram a expressão da proteína anti-HSP70, em diferentes dosagens com a planta *Miconia ferruginata*.

Figura 18 - Análise imuno-histoquímica anti-MCL-1 no tecido do fígado de camundongos *mdx* tratados com diferentes doses do extrato aquoso de folhas de *Miconia ferruginata*.



Legenda: N - Controle negativo da reação. A – Fígado do animal do grupo controle; B - Fígado do animal tratado com 50 mg kg⁻¹; C - Fígado do animal tratado com 100 mg kg⁻¹; D - Fígado do animal tratado com 200 mg kg⁻¹; E - Fígado do animal tratado com 300 mg kg⁻¹; F - Fígado do animal tratado com 2000 mg kg⁻¹. (400X). Barra: 400 µm. Os asteriscos nas figuras mostram a expressão da proteína anti-MCL1, em diferentes dosagens com a planta *Miconia ferruginata*.

6 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa foi possível observar um efeito terapêutico, tanto sobre a redução da inflamação tecidual quanto na redução da fibrose e marcadores de estresse tecidual nos camundongos *mdx* tratados com o extrato bruto aquoso das folhas de *M. ferruginata*, nas doses de 200, 100 e, especialmente na dose de 50 mg/Kg. A DL₅₀ estimada para este extrato foi de 1000 mg/Kg, sendo considerado de toxicidade moderada. O uso popular e o conhecimento tradicional associado têm sido muito utilizados para nortear a busca de novos compostos bioativos para diversos fins terapêuticos. Assim, os levantamentos etnobotânicos se tornam uma ferramenta valiosa nessa seleção de plantas para bioprospecção de produtos naturais (BASSO *et al.*, 2005; SACCARO JR, 2011; PALMA & PALMA, 2012). Segundo ALMEIDA & BANDEIRA (2010) o infuso das folhas da espécie *M. ferruginata* apresenta uso medicinal para fins anti-inflamatórios, como dores de garganta e dermatites. Tendo isso em vista, para este trabalho foi selecionado a forma popular de uso, onde foi avaliado o extrato aquoso das folhas obtidas por infusão. Levando em conta o princípio dos 3R's (redução, substituição e refinamento) (TANNENBAUM & BENNETT, 2015), este trabalho realizou uma avaliação de toxicidade aguda em dose única segundo os critérios da OECD (2001), associado a avaliações do efeito terapêutico sobre os parâmetros clínicos, morfológicos, inflamatórios, sobre a resposta à regeneração e deposição de colágeno (fibrose) em camundongos *mdx*, tratados com diferentes doses de extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata*.

Para assegurar o uso das plantas medicinais se faz necessário realizar testes tanto de eficácia quanto de segurança (TALALAY, 2001; VILAS BOAS, 2006). Desta forma, a toxicidade aguda é o teste de bioatividade capaz de determinar efeitos adversos de curta duração após a administração da droga em uma única dose (OECD, 2001). Vale ressaltar que, o *screening* hipocrático consiste em avaliação comportamental útil na triagem toxicológica de plantas (LUCIO *et al.*, 2000). Neste teste, o extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* mostrou-se tóxico na dosagem de 2000 mg/kg, sendo classificado na categoria 4 da GHS (OECD, 2001), uma vez que houve morte de todos os animais no período de até 48 horas. O efeito tóxico acentuado observado nesta dose, pode ser atribuído a presença de saponinas nas folhas da planta (BARROSO, 2015). As saponinas são metabólitos secundários hemolíticos de característica anfipática, que reduzem a tensão superficial da água e levando à formação de espuma, quando em solução aquosa. Essa capacidade de interação com esteróis, presentes na membrana plasmática, especialmente de eritrócitos, pode acarretar um aumento da

permeabilidade da membrana, provocando a entrada de íons e água para o interior das células com consequente ruptura celular e grande quantidade de hemólise (KARABALIEV & KOICHEV, 2003). Essa capacidade hemolítica das saponinas pode, então estar relacionados ao efeito tóxico observado na maior dose, visto que este metabólito se encontrava mais concentrado.

Além disso, os animais apresentaram sinais de toxicidade nos parâmetros comportamentais e clínicos avaliados, como agitação seguida de letargia, ausência de respostas ao toque e reflexos, redução do consumo de água, alimento e, consequente redução do peso. Além da perda da massa corporal, a ausência de consumo de água e ração consistem em fortes indicadores de toxicidade sistêmica de um composto (MELO, 2001; TEO *et al.*, 2002), reforçando a toxicidade observada para dose de 2000 mg/kg. Outra observação que se pode propor para essa dose, é que as reações comportamentais após a administração intraperitoneal do extrato podem ser devido a uma alteração do equilíbrio dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Visto que, inicialmente houve uma agitação por parte dos animais, possivelmente devido à liberação de neurotransmissores excitatórios e/ou inibição da sua recaptação (SILVA, 2002). No entanto, após cerca de 8 horas após a administração do extrato foi observado um grave efeito depressor, possivelmente pelo esgotamento das vesículas sinápticas dos neurotransmissores excitatórios, ou estimulação prolongada direta de neurotransmissores inibitórios (GOODMAN & GILMAN, 2012). Desta forma, pode-se sugerir que o extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* na dose de 2000 mg/kg pode possuir alguma atividade sedativa ou depressora do SNC, porém faz-se necessário ensaios específicos para determinar essa possível ação.

Na segunda maior dose avaliada, de 300 mg/kg, não foram observadas alterações comportamentais nem clínicas, além da ausência de morte. Assim, segundo critérios da OECD para determinação da DL₅₀, o valor foi considerado de toxicidade moderada, sendo estimado em 1000 mg/kg. Este valor é considerado aceitável para extratos brutos, uma vez que extratos são classificados como nocivos quando apresentam DL₅₀ ≤ 25 mg/kg (REPETTO, 1997). Neste estudo também foi avaliado doses menores que 300 mg/kg, para se investigar os efeitos farmacológicos/terapêuticos *in vivo*, especialmente o possível efeito regenerativo e anti-inflamatório do extrato no modelo animal da distrofia de Duchenne.

Um dos aspectos mais relevantes do estudo da DMD é a avaliação de mecanismos de indução e controle da resposta inflamatória crônica observada nesta patologia, tanto em humanos como no modelo experimental de *mdx* (HORITA & CRUZ, 2017). Provavelmente, a

regulação inflamatória é um evento chave no controle da progressão da doença, onde a principal terapia farmacológica consiste no uso prolongado de glicocorticóides e imunossuppressores, mas essa terapêutica possui muitos efeitos colaterais graves (CIAFALONI & MOXLEY, 2008; ABDEL-HAMID & CLEMENS, 2012; DE LUCA, 2012; WEIN *et al.*, 2015). Porém os mecanismos pelos quais os glicocorticoides atuam na melhora do quadro da DMD, ainda é desconhecido (CAMPBELL & JACOB, 2003), mas foram apontados possível atuação destes na melhora da miogênese, aumento do anabolismo proteico com aumento da massa muscular, aumento dos níveis musculares de creatina e taurina, melhora na estabilização do sarcolema e no transiente intracelular do cálcio, entre outras hipóteses (FEDER *et al.*, 2010).

Assim, a pesquisa de plantas com potencial anti-inflamatório e com menores efeitos tóxicos se apresenta como uma alternativa eficaz, viável, de baixo custo e segura para os pacientes de DMD. Neste contexto, associado à crença popular, ensaios *in vitro*, tem demonstrado que o extrato de *M. ferruginata* promove uma redução dose-dependente do *burst* respiratório de neutrófilos (LIMA, 2016; CRUZ, 2017) e da proliferação de linfócitos estimulados (BARROSO, 2015), podendo ser um possível agente anti-inflamatório natural. Estes resultados anteriores despertaram o interesse em se avaliar concomitantemente os efeitos anti-inflamatórios, anti-fibróticos, regenerativos e a toxicidade do extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* nesta pesquisa. Visto que, os compostos presentes no extrato aquoso, tais como os flavonoides e taninos já foram relatados apresentar ação antioxidante e anti-inflamatória (GREGÓRIO *et al.*, 2005; ATESSAHIN *et al.*, 2007; BIESALSKI, 2007; SANDHAR *et al.*, 2011).

O modelo murino da DMD, o camundongo *mdx* possui particularidades histopatológicas típicas da distrofia muscular pseudo-hipertrófica. Os animais, entre 4 e 12 semanas de idade apresentam ciclos de regeneração pós-necrose, com múltiplos focos necróticos, infiltração inflamatória densa e liberação de altas concentrações de creatina quinase no plasma (KLYEN *et al.*, 2011). O tecido pulmonar apresenta aumento de fibras colágenas por todo parênquima pulmonar, característico de fibrose (LESSA *et al.*, 2015). Assim como, os processos de degeneração e regeneração do tecido, especialmente no músculo, gera um processo fibrótico que persiste por toda a vida do animal. Dentre os músculos, o diafragma é o primeiro a ser acometido, sendo severamente afetado com progressiva perda da função contrátil e enfraquecimento muscular, semelhante ao que se observa na doença humana (COIRAULT *et al.*, 2003).

Neste trabalho, as alterações histopatológicas mais severas ocorreram nos animais tratados com a dose 2000mg/kg em todos os tecidos avaliados. Nesta dose os tecidos apresentavam aumento da degeneração hidrópica com inúmeras fissuras, grandes áreas de necrose e presença de infiltrado inflamatório denso. No músculo tibial, houve ainda aumento da degeneração, lesões musculares e do depósito de colágeno. Essas alterações histopatológicas, revelam que o extrato aquoso da *M. ferruginata* induz a um aumento do estresse celular, condizentes com toxicidade sistêmica observada nesses animais (KUMAR *et al.*, 2013). Além disso, o infiltrado inflamatório exarcebado pode ter contribuído, em parte, com o aumento das lesões teciduais observadas (YONEKAWA & HARLAN, 2005). Os animais tratados com a dose de 300 mg/kg, apesar de não apresentarem alterações comportamentais, apresentaram as mesmas alterações histopatológicas que o grupo de 2000mg/kg, nos diferentes tecidos avaliados, porém em menor grau severidade. Revelando que, esta dose também apresenta certa toxicidade, promovendo aumento do estresse celular, quando comparado ao grupo controle.

Entretanto, para os animais tratados com as doses de 200, 100 e 50 mg/kg do extrato, houve uma redução das alterações histopatológicas de forma dose-dependente. Nos tecidos avaliados foi possível verificar uma redução das degenerações hidrópicas, áreas de necrose e apoptose, e do infiltrado inflamatório, quando comparado as alterações típicas ocorridas no grupo controle. Em que, de forma impressionante o extrato na dose de 50 mg/kg mostrou uma reversão do quadro de degenerações e necrose característico da DMD, promovendo uma regeneração tecidual e redução significativa do infiltrado inflamatório. Frente a esses resultados, pode-se sugerir que o extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* atua como anti-inflamatório natural e, conseqüente na regeneração muscular. Visto que, o processo inflamatório promove uma aceleração do processo de degeneração muscular e progressão da DMD (HORITA & CRUZ, 2017), por produzir radicais livres e outros mediadores, como oxidantes, proteases, lipídios bioativos e citocinas, substâncias lesivas ao tecido afetado, aumento assim o dano tissular (NATHAN, 2002; YONEKAWA & HARLAN, 2005). Assim, compostos que reduzem a inflamação tecidual, provocam retardo da progressão da doença e podem até atuar com indutores da regeneração tecidual.

Neste contexto, os resultados obtidos nesta pesquisa podem contribuir com o desenvolvimento de nova terapia adjuvante para a DMD. Mas ainda são necessários testes mais específicos para comprovar e esclarecer os mecanismos da ação anti-inflamatório do

extrato, tais como dosagens séricas e teciduais de citocinas inflamatórias, quantificação de células inflamatórias, redução do estado redox tecidual e outros.

Outro aspecto característico da DMD avaliado foi a fibrose, que consiste na deposição de componentes da matriz extracelular, especialmente fibras colágenas de forma descontrolada e excessiva. Uma das principais características da fibrose no DMD é a contribuição do processo inflamatório nesse processo, acarretando diminuição da funcionalidade tecidual (KHARRAZ *et al.*, 2014). Os perfis celulares mais encontrados são: linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, células exterminadoras naturais (NK), eosinófilos e macrófagos (VILLALTA *et al.*, 2009). Para quantificação da fibrose foi utilizado a coloração de *Picrosírius red*, uma das técnicas histoquímicas mais bem compreendidas, capazes de destacar seletivamente as redes de colágeno, de forma específica quando combinada com a microscopia de luz polarizada (RITTIÉ, 2017).

Na quantificação percentual média da área de fibrose foi possível observar que nas doses de 2000 e 300 mg/kg apresentaram perfil de deposição de colágeno semelhante ao grupo controle, no fígado e no pulmão. Já para as doses de 200, 100 e 50 mg/kg houve uma redução significativa ($p < 0,001$) da deposição de colágeno e, conseqüente menor fibrose tecidual. Somente para o músculo tibial a dose de 2000 mg/kg mostrou um aumento da deposição de colágeno, enquanto, as doses de 300, 200, 100 e 50 mg/kg apresentaram uma redução da deposição de colágeno significativa e de forma dose-dependente. Desta forma, de acordo com os resultados aqui apresentados, é possível perceber uma associação direta entre a redução do processo inflamatório e conseqüente redução da fibrose, sendo a dose de 50 mg/kg a mais promissora.

Por fim, foi avaliado a marcação de proteínas intracitoplasmáticas envolvidas no processo de citoproteção, quando as células estão submetidas a condições ou ambiente adverso à sobrevivência, tais como aumento de temperatura, estresse osmótico, oxidativo e outros (BUKAU & HORWICH, 1998). A HSP70 pertence ao grande grupo de proteínas conhecidas como chaperonas moleculares, que são superexpressadas durante episódios estressantes agudos e crônicos, e apresenta função citoprotetora (SLIMEN *et al.*, 2016), sendo muito utilizadas como marcadores de níveis de estresse celular (COLE & MEYERS, 2011). Já a MCL-1 é uma proteína da família das proteínas Bcl-2, que apresenta ações anti-apoptóticas. Esta proteína está localizada na membrana externa da mitocôndria, do retículo endoplasmático e do núcleo celular. A proteína MCL-1 neutraliza a função pró-apoptótica de *Bim* e impede a ativação de receptores de morte (WUILLÈME-TOUMI *et al.*, 2006).

Níveis aumentados de MCL-1 interferem na permeabilidade da membrana

mitocondrial e na ativação da via extrínseca da apoptose, contribuindo para o perfil de resistência à apoptose (GASPAROTTO *et al.*, 2011). A HSP 70, em associação com a co-chaperona HSP40 pode interferir no balanço de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e MCL-1, e atuam também no balanço da apoptose. Assim, a superexpressão da proteína HSP70 exerce um papel crucial na manutenção celular, sendo considerado como um parâmetro de estresse e lesão celular reversível (CASTRO *et al.*, 2013). Já a MCL-1 representa uma prevenção e estimulação a sobrevivência celular.

Condizente com as observações histopatológicas, houve uma grande expressão do marcador de estresse celular estudado, a HSP70 em todos os órgãos dos animais tratados com a dose de 2000 mg/kg. Para a dose de 300 mg/kg foi observado um moderado aumento desse marcador quando comparado com o grupo controle. Esse dado reforça os achados anteriores de toxicidade, promovida pelo extrato nestas duas doses, visto que a elevação desta proteína no citoplasma ocorre quando a célula se encontra submetida a algum tipo de estresse celular (COLE & MEYERS, 2011; CASTRO *et al.*, 2013). As doses de 200, 100 e 50 mg/kg mostraram uma redução dose-dependente desse marcador em comparação ao grupo controle. Para a dose de 50 mg/kg essa redução superou o grupo controle. Para a marcação de MCL-1 no fígado, foi observado que os animais tratados com as doses de 2000 e 300 mg/kg mostraram-se semelhantes ao grupo controle. Já as demais doses, houve um aumento dose-dependente da proteína, com especial destaque a dose de 50 mg/kg. Esses dados sugerem que as doses de 200, 100 e 50 mg/kg apresentam maior proteção celular, uma vez que o aumento da proteína antiapoptótica, MCL-1, promove uma redução das taxas de apoptose e aumento da sobrevivência celular (WUILLÈME-TOUMI *et al.*, 2006). Nossos resultados sugerem que o extrato nas doses de 200 e 100 mg/kg promove uma redução do dano celular e, conseqüente redução da apoptose. Sendo que, a dose de 50 mg/kg mostrou ter um elevado potencial regenerativo da degeneração e redução do estresse celular, bem como efeito anti-inflamatório.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- ✓ O extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* foi considerado moderadamente tóxico quando administrado por via intraperitoneal na dose de 2000 mg/kg;
- ✓ A DL₅₀ foi estimada em 1000 mg/kg;
- ✓ Na dose de 2000 mg/kg houve alterações comportamentais segundo *screening* hipocrático, além de alterações histológicas e morfológicas severas, além de aumento da fibrose, marcadores de estresse celular e de processo inflamatório em todos os tecidos avaliados (fígado, pulmão e músculo tibial anterior), indicativas da toxicidade sistêmica;
- ✓ Na dose de 300 mg/kg, apesar de não mostrar alterações comportamentais e clínicas houve alterações histológicas, morfológicas, presença considerável de fibrose, marcadores de estresse celular e processo inflamatório de grau moderado, em todos os tecidos avaliados;
- ✓ Nas doses de 200, 100 e 50 mg/kg houve uma correlação dose-dependente, com redução da necrose, degeneração celular e processo inflamatório. Bem como, redução dos marcadores de estresse celular, aumento da proteína anti-apoptótica e redução das áreas de fibrose, especialmente no músculo tibial anterior.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extrato aquoso das folhas de *M. ferruginata* obtidos por infusão, demonstrou potencial anti-inflamatório, função regenerativa e anti-fibrotótica. Nossos dados demonstraram possíveis efeitos promissores do uso deste extrato no tratamento de doenças degenerativas agravadas pelo processo inflamatório crônico, como a distrofia muscular de Duchenne. Ainda são necessárias mais pesquisas, principalmente sobre os efeitos terapêuticos e de segurança do extrato de *M. ferruginata* em uso prolongado, além de investigar outros parâmetros histopatológicos e moleculares envolvidos na resposta terapêutica.

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, H.; CLEMENS, P. R. Pharmacological therapies for muscular dystrophies. **Current opinion in neurology**, v. 25, n. 5, p. 604–8, 2012.

ACUNZO, J.; KATSOGIANNOU, M.; ROCCHI, P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), α B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 44, n. 10, p. 1622-1631, 2012.

ALBUQUERQUE, L. B.; AQUINO, F. G.; COSTA, L. C.; MIRANDA, Z. G.; SOUSA, S. R. Espécies de Melastomataceae Juss. com potencial para restauração ecológica de Mata Ripária no Cerrado. **Polibotânica**, v. 35, n. 35, p. 1-19, 2013.

ALMEIDA, R. N. *et al.* Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72 – 6. 1999.

ALMEIDA, V. S.; BANDEIRA, F. F. The cultural significance of use of caatinga plants by Quilombolas of the Raso Catarina, Jeremoabo district, Bahia, Brazil. **Rodriguésia**, v. 61, n. 2, p. 195-209, 2010.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. C.; SILVA, M. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-9, 2008.

ARAÚJO, A. Q. C.; *et al.*; Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy. Part 1: diagnosis, steroid therapy and perspectives. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 2017, p. 104-113, 2017.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro - Conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p.1-6, 2005.

ASEA, A. A.; DE MAIO, A. **Protein Reviews**. Volume 1, Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity - Edited, v.1, cap.7, Ed. Springer, 2007.

ATALAY, M.; *et al.*; Heat shock proteins in diabetes and wound healing. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 85-95, Feb. 2009.

ATESSAHIN, A. *et al.*; Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 100, p. 121-126, 2007.

BAKKER, J. P.; DE GROOT, I. J.; BEELEN, A.; LANKHORST, G. J. Predictive factors of cessation of ambulation in patients with Duchenne muscular dystrophy. **Am J Phys Med Rehabil.** v. 81, n. 12, p. 906-12, 2002.

BARROSO, P. R.; Otoni, T. J. O.; Mendes, J. P. G.; Machado, E. L. M.; Martins, H. R.; Gregorio, L. E. Volatiles from aerial parts of *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae) by HS-SPME and GC-MS. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 53, p. 167-168, 2017.

BARROSO, P.R. **Fitoquímica e atividades biológicas de *Miconia ferruginata* DC. (Melastomataceae)**. 255p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFVJM, Diamantina, MG, 2015.

BASSO, L. A. *et al.* The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p.475-506, 2005.

BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. D. R.; TAVARES, R. A. M. Nomenclatural notes on *Behuria* (Meranieae, Melastomataceae). Considerações taxonômicas e biogeográficas. **Bradea**, v. 10, p. 75 – 80, 2010.

BAUMGRATZ, J. A.; et al.; **Melastomataceae** – Lista de espécies da flora do Brasil. 2014. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB161>. Acesso em: 25/08/2020.

BECKMANN, R.P.; MIZZEN, L.A.; WELCH, W.J. Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implication for protein folding and assembly. **Science.**, v. 248, p. 850-854, 1990.

BIESALSKI, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, n. 6, p. 724-8, 2007.

BOBO, J. K.; KENNESON, A.; KOLOR, K.; BROWN, M. A. Adherence to American Academy of Pediatrics recommendations for cardiac care among female carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. **Pediatrics**, v. 123, p. e471-e475, 2009.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T. O.; KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **J Mol Med**, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, G. R. R.; GOULART, L.O.; MONTE-MÓR, R.L. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 127-36, 2008.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE no. 90/2004. **Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos**. Diário Oficial da República federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, DF. 12 de março de 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Versão 2. Brasília, DF. p. 6-7, 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014. **Anexo I - Lista Nacional Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**, Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, p.110-30, 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 123. p. 2014b.

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MAGYAR, J.P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. **Neuromuscul. Disord.**, v. 14, n. 10, p. 675-82, 2004.

BUKAU, B.; HORWICH, A. The Hsp70 and Hsp60 chaperonin machines. **Cell**. v. 92, p. 351-66, 1998.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, n. 4, p. 1189-92, 1984.

BUSHBY, K.; et al.; Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. **Muscle Nerve**., v. 50, n. 4, p. 477-487, 2014.

CAMPBELL, C.; JACOB, P. Deflazacort for the treatment of Duchenne dystrophy: a systematic review. **BMC Neurol**. v. 3, n. 1, p. 7-17, 2003.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.18, n.1, supl. I, p.373-82, 2016.

CARMEN, L.; et al.; Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in Duchenne muscular dystrophy. **Glycobiology**., v. 29, n. 2, p. 110–123, Feb., 2019.

CARNEVALI, O.; MARADONNA, F. Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. **Gen. Comp. Endocr.**, v. 131, p. 203-209, 2003.

CASTRO, S. V. *et al.* Proteínas de choque térmico HSP 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 7, n. 4, p. 261-71, 2013.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma 55 abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo**, v.40, 2004.

CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; SPESSOTO, M. A.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Evaluation of the in vitro activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 339-40, 2003.

CHAMBERLAIN, J.R.; CHAMBERLAIN, J.S. Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. **Mol. Ther.**, v. 25, n. 5, p. 1125-1131, 2017.

CIAFALONI, E.; MOXLEY, R. T. Treatment options for Duchenne muscular dystrophy. **Curr Treat Options Neurol**. v. 10, n. 2, p. 86-93, 2008.

COIRAULT, C. *et al.* Severe muscle dysfunction precedes collagen tissue proliferation in mdx mouse diaphragm. **J Appl Physiol**. v. 94, n. 5, p. 1744-50, 2003.

COLE, J. A.; MEYERS, S. A. Osmotic stress stimulates phosphorylation and cellular expression of heat shock proteins in rhesus macaque sperm. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 4, p. 402-10, 2011.

CORDOBA, M. A. M. **Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos vegetais de *Pseudobrickellia brasiliensis* (spreng) r. M. King & h. Rob, *Miconia ferruginata* DC e *Ageratum fastigiatum* (garn.) R. M. King sobre células tumorais Jurkat.** 123p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFVJM, Diamantina, MG, 2017.

CRUZ, D. B. **Atividade Antioxidante e Citotoxicidade de Plantas do Campo Rupestre Brasileiro: *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Miconia ferruginata* DC. e *Vochysia elliptica* Mart.** 106p. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFVJM, Diamantina, MG, 2017.

CRUZ, A. M.; KAPLAN, M. C. Uso Medicinal de Espécies das Famílias *Myrtaceae* e *Melastomataceae* no Brasil. **Revista de Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Médica**, v. 69, p. 470–2, 2003a.

CUNHA, W. R.; ANDRADE-SILVA, M. L.; TURATTI, I. C.; FERREIRA, D.; BETARELLO, H. L. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia lingustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 2, n. 84, p. 47-9, 2003b.

CUNHA, W. R.; et al.; A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 6, p. 474-8, 2006.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* Trypanocidal activity of Triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 470 – 2, 2008.

CUNHA, W. R.; et al.; Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 2, p. 166-9, 2010.

CUNHA, G.O.S.; et al.; Atividade antimicrobiana de compostos isolados e derivados semissintéticos de *Miconia ferruginata*. **Acta Brasiliensis**, v. 4, n. 1, p. 49-52, Jan., 2020.

DALAKAS, M. C. Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 37, n. 3, p. 226 – 42, 2011.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, p. 235–249, 2011.

DE LUCA, A. Pre-clinical drug tests in the mdx mouse as a model of dystrophinopathies: **An overview.** **Acta Myologica**, v. 31, p. 40–7, 2012.

DE SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica. Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-42, 2006.

DEANE, E.E.; WOO, N.Y.S. Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. **Rev. Fish. Biol. Fisher.**, v. 21, p. 153-185, 2011.

DINIZ, R.; VIDIGAL, M. S.; RASLAN, D. S.; FERNANDES, N. G. A new triterpene of *Miconia macrothyrsa* leaves: 28-carboxy-3-oxoolean-12-en-21a-yl acetate. **Acta Crystallographica**, v. 62, p. 4891-93, 2006.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, p.853-916, 2001.

DOS SANTOS, D.Y.A. **Botânica Aplicada: Metabolitos secundários na interação planta-ambiente**. 124f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2015.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. New York: McGraw-Hill, 1937p. p.1133-87, 1994.

ERVASTI, J. M. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n. 2, p. 108-17, 2007.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 61, p. 243-282, 1999.

FEDER, D.; et al.; Duchenne muscular dystrophy: a review of corticosteroid based treatment. **Salud. Ciencia (Impresa)**, v. 17, n. 5, p. 418-422, May., 2010.

FERRETTI, R.; MARQUES, M.J.; PERTILLE, A.; SANTO NETO, H. Sarcoplasmicendoplasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 39, v. 5, p. 609-15, 2009.

FIRMINO, F.C. BINSFELD, P.C. **A biodiversidade brasileira como fonte de medicamentos para o SUS**. Disponível em:<http://www.cpgls.ucg.br>. Acesso em 20 de março de 2020.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, 2006.

FRAYSSE, B. *et al.* Gait characterization in golden retriever muscular dystrophy dogs using linear discriminant analysis. **BMC Musculoskelet. Disord**. v. 18, p. 153, 2017.

FREZZA, R. M.; DA SILVA, S. R.N.; FAGUNDES, S. L. Update on the physical therapeutic treatment of the muscular dystrophies of Duchenne and Becker. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. v. 18, n. 1, p. 41-9, 2005.

GAIAD, T. P., et al. Lowintensity training provokes adaptive extracellular matrix turnover of a muscular dystrophy model. v. 13, n. 6, p. 693–703, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5747205/>.

GASPAROTTO, E. P. L. *et al.* Deregulated expression of A1, Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 antiapoptotic proteins and Bid, Bad, and Bax proapoptotic genes in polycythemia vera patients. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, p. 873-86, 2011.

GATIS-CARRAZZONI, A.S.G.; et al.; Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the leaf methanol extract of *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. and characterization of compounds by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 392, p. 55–68, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLDENBERG, R.; CADDAH, M. Taxonomic notes on South American *Miconia* (Melastomataceae) III. **Phytotaxa**, v. 94, n. 1, p. 13-22, 2013.

GOLDENBERG, R.; CADDAH, M. K. *Miconia*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil** (LEFB). Rio de Janeiro, RJ: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9692>. Acesso em: 23 Jul. 2019.

GOMES, A. L. O. *et al.* Desempenho motor e funcional na Distrofia Muscular de Duchenne: estudo de um caso. **Journal of the Health Sciences Institute, São Paulo**, v. 29, n. 2, p. 131–5, 2011.

GONTIJO, D.C.; et al.; Antioxidant study indicative of antibacterial and antimutagenic activities of an ellagitannin-rich aqueous extract from the leaves of *Miconia latecrenata*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 236, p. 114-123, 2019.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 Ed. Editora McGrallHill, 2012; 757-69.

GROUNDS, M. D.; RADLEY, H. G.; LYNCH, G. S.; NAGARAJU, K.; DE LUCA, A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiol Dis**, v. 31, n. 1, p. 1-19, 2008.

GRUNWALD, M.S.; et al.; The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. **Cell Stress Chaperones.**, v. 19, n. 6, p. 913-925, 2014.

GUGLIERI, M.; BUSHBY, K. Molecular treatments in Duchenne muscular dystrophy. **Current Opinion of Pharmacology**, v. 10, p. 331-7, 2010.

GUNATILAKA, A. A.; et al.; Isolation, synthesis, and structure-activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 2-5, 2001.

HAMILTON, K. L.; MBAI, F. N.; GUPTA, S.; KNOWLTON, A. A. Estrogen, Heat Shock Proteins, and NF_Β in Human Vascular Endothelium. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, p. 1628-1633, 2004.

HECK, T.G.; SCHOLER, C.M.; DE BITTENCOURT, P.I. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling fator from immune system to the brain? **Cell biochemistry and function, Chichester.**, v. 29, n. 3, p. 215-226, 2011.

HIGUCHI, C. T. **Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados.** 2007. 86 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2007.

HORITA, S. I. M.; CRUZ, F. M. Duchenne Muscular Dystrophy: Cellular, Tissue and Treatment Events. **Episteme Transversalis**, [S.l.], v. 6, n. 2, 2017.

HOUDE, S. *et al.* Deflazacort use in Duchenne muscular dystrophy: an 8-year follow-up. **Pediatr Neurol.** v. 38, n. 3, p. 200-6, 2008.

JARRAH, A. S.; CASTIGLIONE, F.; EVANS, N. P.; GRANGE, R. W.; LAUBENBACHER, R. A Mathematical Model of Skeletal Muscle Disease and Immune Response in the *mdx* Mouse. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1 – 11, 2014.

JAATTELÄ, M.; WISSING, D. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. **Ann. Med.**, v. 24, p. 249-258, 1992.

JOLY, C.A. *et al.* Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP [online]**. n. 89, p. 114-33, 2011.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach.** 3^o edição. Massachusetts U.S.A Sinauer Associates, 2010. 576 p.

KAMPINGA, H.H.; *et al.*; Guidelines for nomenclatures of the human heat shock proteins. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, p. 105-111, 2009.

KARABALIEV, M.; KOICHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B**, v. 88, p. 101-105, 2003.

KHARRAZ, Y. *et al.* Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

KLYEN, B. R.; SHAVLAKADZE, T.; RADLEY-CRABB, H. G.; GROUNDS, M. D.; SAMPSON, D. D. Identification of muscle necrosis in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy using threedimensional optical coherence tomography. **J Biomed Opt.** v. 16, n. 7, p. 076013, 2011.

KUEH, S. L.; HEAD, S.I.; MORLEY, J. W. GABA(A) receptor expression and inhibitory post-synaptic currents in cerebellar Purkinje cells in dystrophin-deficient *mdx* mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 35, n. 2, p. 207-10, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KUTCHAN, T.M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology.**, v. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.

LEFAUCHEUR, J. P.; PASTORET, C.; SEBILLE A. Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. **Anat Rec.** v. 242, n. 1, p.70-6, May 1995.

LESSA, T. B.; ABREU, D. K.; BERTASSOLI, B. M.; AMBRÓSIO, C. E. Arquitetura comparativa dos pulmões de camundongos normais e afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 35, n. Supl.1, p. 56-60, 2015.

LI, X. C.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; ELISOHLY, H. N.; NINROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1282-5, 2001.

LIMA, P. D. A. **Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de plantas do cerrado: *Ageratum fastigiatum* (GARDN.) R. M. KING et H. ROB., *Croton antisiphiliticus* MART., *Kielmeyera rubriflora* CAMB., *Miconia ferruginata* DC., E *Norantea adamantium* CAMB.** 114f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2016.

LIN, J.; GUO, W. J.; YANG, Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanoic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. **World Journal of Gastroenterology**, v.8, p. 493-95, 2002.

LIPNICK, R. L.; et al.; Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. **Fd. Chem. Toxicol.**, v. 33, p. 223-231, 1995.

LOCKE, M.; NOBLE, E.G.; ATKINSON, B.G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. C723-C729, 1990.

LOCKE, M.; NOBLE, E.G.; Stress Proteins: The Exercise Response. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 20, n. 2, p. 155-167, 1995.

LUCIO, A. D.; BANZATTO, D. A.; STORCK, L. Interferência do manejo das culturas sobre o erro experimental. **Científica, São Paulo**, v.28, n.1/2, p.33-43, 2000.

MACIEL, M. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR. V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natural products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal Ethnopharmacology**, v. 8, p. 127-47, 1983.

MANCINI, E.; DE MARTINO, L.; BELISARIO, M. A.; DE FEO, V. Flavonoids of *Miconia alypifolia* and their antioxidant activity. **Pharmacology (online)**, v. 2, p. 452- 60, 2008.

MARQUES, M. J.; FERRETTI, R.; VOMERO, V. U.; MINATEL, E.; NETO, H. S. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**. v. 35, n. 3, p. 349-53, 2007.

McDONALD, C. M. Physical activity, health impairments, and disability in neuromuscular disease. **Am J Phys Med Rehabil**. v. 81, n. 11, p. S108-20, 2002.

MELO, F.B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos.** 120p. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters, Amsterdam**, v.140, p.21-30, 2003.

MINATEL, E.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 5, p. 561-569, 2003.

MONTEIRO, M. V.; LEITE, L. M.; BERTINI, S. M.; MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378 – 82, 2007.

MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas & Plantas Medicinais**: Doenças, Aplicações, Descrição e Propriedades. 9.ed. 555p. São Paulo: Hemus, 2003.

NAIR, S. K. P. *et al.* Dis-abilities in children with Duchenne muscular dystrophy: a profile. **J. Rehabil Med.** v. 33, p.147-9, 2001.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NEVES, S. M. P. *et al.* Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. 234p. São Paulo-SP, 2013.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 3, p. 629-61, 2016.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidance Document on the Recognition. **Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation Environmental Health and Safety.** Monograph Series on Testing and Assessment n. 19, 2000.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **New Directions in Health Care Policy.** Paris: Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **The World Health Report 1998**: Life in the 21st century a vision for all. Geneva: WHO; 1998. p. 61-111.

ORTEZ, C.; *et al.*; Avances en el tratamiento de la distrofia de Duchenne. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 79, n. III, p. 77-81, 2019.

PALMA, C. M.; PALMA, M. S. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. **Ciências Cultural [online]**. v. 64, n. 3, p. 22-6, 2012.

PARCELLIER, A.; *et al.*; Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochem. Bioph. Res. C.**, v. 304, p. 505-512, 2003.

PAYNE, E. T.; YASUDA, N.; BOURGEOIS, J. M.; DEVRIES, M. C.; RODRIGUEZ, M. C.; YOUSUF, J.; TARNOPOLSKY, M. A. Nutritional therapy improves function and complements corticosteroid intervention in *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v. 33, n. 1, p. 66-77, 2006.

PERTILLE, A.; DE CARVALHO, C. L. T.; MATSUMURA, C. Y.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M. J. Calcium-binding proteins in skeletal muscles of the *mdx* mice: potential role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. **Int J Exp Pathol**, v. 91, n. 1, p. 63- 71, 2010.

PICHAVANT, C. *et al.* Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. **Mol Ther.** v. 19, n. 5, p. 830-40, May 2011.

PIERONI, L. G.; DE REZENDE, F. M.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9439-50, 2011.

PIERONI, A. *et al.* Local Knowledge on Plants and Domestic Remedies in the Mountain Villages of Peshkopia (Eastern Albania). **Journal of Mt. Sci.**, v. 11, n.1, p. 180 – 94, 2014.

PORTER, J.D.; MERRIAN, A.P.; LEAHY, P.; GONG, B.; KHANNA, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophindeficient (*mdx*) mice. **Hum. Mol. Genetics.**, v. 12, n. 15, p.1813-1821, 2003.

PORTER, C.M.; JANZ, D.M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 54, n. 2, p. 199-206, 2003.

PRICE, F.D.; KURODA, K.; RUDNICKI, M.A. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1772, p. 272–283, 2007.

QUEIROZ, S. **Tratado de toxicologia ocupacional**. 2. ed. 554 p. Rio de Janeiro: Biblioteca 24 Horas, 2015.

RAN, R.; LU, A. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. **Genes Dev.**, v. 18, n. 12, p. 1466-1481, Jun. 2004.

REBECCA, M. A. *et al.* Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.101-4, 2002.

RENNER, S. S.; TRIEBEL, D.; ALMEDA, F.; STONE, D.; ULLOA, C. U.; MICHELANGELI, F. A.; GOLDENBERG, R.; CIFUENTES, H. M. **Melastomataceae.net**. Disponível em: www.melastomataceae.net. Acesso em: 25/08/2020.

REPETTO, M. **Toxicologia fundamental e experimental**. 3.ed Madrid: Diaz de Santos, p.291-300. 1997.

RESENDE, F. A.; BARCALA, C. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic and oleanoic acid against doxorubicininduced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Sciencis**, v. 79, p. 1268-73, 2006.

REZENDE, A. V.; WALTER, B. T.; FAGG, C. W. **Cerrado: Ecologia e Flora**. Embrapa. v. 2, 2008. 876 p.

REZENDE, A. R. **Sistemática e conservação de *Miconia* seção *Miconia* DC. (Melastomataceae) no estado de Minas Gerais, Brasil**. 2012. 117 p. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2012.

- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In.: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. *Ecologia e flora*. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p. 152-212, 2008.
- RITTIÉ L. Method for *picrossiriu red*-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. **Methods in Molecular Biology**. v. 1627, p. 395-407, 2017.
- RITOSSA, F. M. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.
- RODRIGUES *et al.* **Difusão do uso de plantas medicinais com ação antiparasitária em Escolas Públicas do Município de Patos, PB**. In: Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. Belo Horizonte: [s.n.], set. 2004.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. An unusual C6– C60 linked flavonoid from *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**. v. 68, p. 1781–84, 2007.
- RODRIGUES, J.; PAGANOTTE, D. R.; ZOCCOLO, D.; SANTOS, G.; VILEGAS, L. SALGADO, W. H. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 120 - 6, 2008.
- RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SILVA, M. A.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Secondary Metabolites of *Miconia rubiginosa*. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n. 7/8, p. 834–9, 2011.
- ROLLAND, JF.; DE LUCA, A.; BURDI, R.; ANDREETTA, F.; CONFALONIERI, P.; CAMERINO, D. C. Overactivity of exercise-sensitive cation channels and their impaired modulation by IGF-1 in *mdx* native muscle fibers: beneficial effect of pentoxifylline. **Neurobiol Dis**, v. 24, n. 3, p. 466-74, 2006.
- ROMERO, R.; MARTINS, A. B. Melastomataceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n.1, p. 19-24, 2002.
- SACCARO JR, N. L. **Desafios da Bioprospecção no Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Ipea, Brasília, 2011. 38 p.
- ROSENZWEIG, R.; NILLEGODA, N.B.; MAYER, M.P.; BUKAU, B. The Hsp70 chaperone network. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 11, p. 665-680, 2019. SANDHAR, H. K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 25–41, 2011.
- SANTOS, N. M.; *et al.* Functional and Clinical Profile of Duchenne muscular dystrophy patients attending the Brazilian Association of muscular dystrophy (ABDIM). **Rev Neurocienc**. v. 14, n. 1, p.15-22, 2006.
- SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 55-53, 2000.

SARLO, L. G.; DA SILVA, A. F.; MEDINA-ACOSTA, E. Diagnóstico molecular da distrofia muscular Duchenne. **Revista Científica da FMC**. v. 4, n 1, p. 2-9, 2009.

SASAOKA, T. *et al.* Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in g-sarcoglycan-deficient mice. **Neuromuscular Disorders**. v. 13, p. 193–206, 2003.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4. ed. Barueri: Manoele, 2002.

SEEMANN, N.; SELBY, K.; McADAM, L.; BIGGAR, D.; KOLSKI, H.; GOOBIE, S.; YOON, G.; CAMPBELL, C. Symptomatic dystrophinopathies in female children. **Neuromuscul Disord**, v. 21, n. 3, p. 172-7, 2011.

SEIXAS, S. L. *et al.* Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arq. Neuro-Psiquiatr., São Paulo**, v. 55, n. 3B, p. 610-617, Sept. 1997.

SERPELONI, J. M.; et al.; Cólus, *In vivo* assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test, **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 501–7, 2008a.

SERPELONI, J. M.; VILEGAS, W.; VARANDA E. A.; CÓLUS, I. M. *In vivo* evaluation of anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of *Miconia* genus using the micronucleus test. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008b.

SHAVLAKADZE, T.; WHITE, J.; HOH, J.F.; ROSENTHAL, N.; GROUNDS, M.D.; 92 Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. **Mol. Ther.**, v. 10, p. 829-843, 2004.

SIEMIONOW, M.; et al.; Cardiac protection after systemic transplant of dystrophin expressing chimeric (dec) cells to the *mdx* mouse model of duchenne muscular dystrophy. **Stem Cell Rev Rep**. v. 15, n. 6, p. 827-41, 2019.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 334p.

SILVA, N.L.A. et al. Triagem fitoquímica de Plantas do Cerrado da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias – Maranhão. **Scientia plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SILVA, A.G.; et al.; Matteucinol, isolated from *Miconia chamissois*, induces apoptosis in human glioblastoma lines via the intrinsic pathway and inhibits angiogenesis and tumor growth *in vivo*. **Invest New Drugs.**, v. 38, n. 4, p. 1044-1055, 2020.

SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, S. C.; MELO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SLIMEN, I. B.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; ABDERRABBA, M. Heat stress effects on livestock: Molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 100, n. 3, p. 401–12, 2016.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira.** Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, 2005.

STUART, R.A.; CYR, D.M.; NEUPERT, W. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. **Experimentia**, v. 50, p. 1002-1011, 1994.

TAKAYAMA, S.; REED, J. C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, p. 9041-9047, 2003.

TALALAY, P. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. **Academic Medicine**, v.76, p.238-47, 2001.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosomelinked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. **Acta Neuropathol. Berlin**, v. 69, p. 91-95, 1986.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. **J Am Assoc Lab Anim Sci**. v. 54, n. 2, p. 120-32, 2015.

TANIGUTI, A. P. T. **Fibrose muscular em camundongos *mdx*: Efeitos do exercício físico e agente anti-fibrótico.** 90f. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIROPES, A.; KHETANI, V.A. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-96, 2002.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S. S. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-17, 2011.

TOLEDO, A. C. O. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacocinética. **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Ciênc Farm. [Internet]**. v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VASCONCELOS, M. A.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E.; ANDRADE E SILVA, M. L.; CARVALHO, J. C.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. in vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 61, n. 7-8, p. 477-82, 2006.

VEIGA Júnior V. F.; PINTO. A. C.; MACIEL. M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**. v.28, n.3, p.519-28, 2005.

VENUGOPAL, V.; PAVLAKIS, S. Duchenne Muscular Dystrophy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Janeiro de 2020 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482346/>. Acesso em: 21/08/2020.

VIEGAS, F.P.D.; et al.; Leishmanicidal and antimicrobial activity of primin and primin-containing extracts from *Miconia willdenowii*. **Fitoterapia.**, v. 138, p. 104297, 2019.

VILLALTA, S. A.; NGUYEN, H. X.; DENG, B.; GOTOH, T.; TIDBALL, J. G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Hum Mol Genet.** v. 18, n. 3, p. 482-96, 2009.

VILAS BOAS, O. M. G. C. **Farmacologia.** Alfenas: 2006. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/53304325/1/Historia-da-Farmacologia>. Acesso em 26 março de 2020.

WEBER, L.P.; JANZ, D.M. Effect of α -naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. **Aquat. Toxicol.**, v. 54, n. 1-2, p. 39-50, 2001.

WEBSTER, J.M.; et al.; Small Heat Shock Proteins, Big Impact on Protein Aggregation in Neurodegenerative Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1047, Sep. 2019.

WEGNER, K. A.; KEIKHOSRAVI, A.; ELICEIRI K, W.; VEZINA, C. M. Fluorescence of *Picrosirius Red* Multiplexed with Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 479-90, 2017.

WEIN, N.; ALFANO, L.; FLANIGAN, K. M. Genetics and Emerging Treatments for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 3, p. 723-42, 2015.

WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiol. Rev.**, v. 72, n. 4, p. 1063-1081, 1992.

WILLMANN, R.; POSSEKEL, S.; DUBACH-POWEL, L.; MEIER, T.; RUEGG, M. A. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v. 19, n. 4, p. 241-9, 2009.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 7, p. 657-62, 2006.

WONG, T.W.Y.; COHN, R.D. Therapeutic Applications of CRISPR/Cas for Duchenne Muscular Dystrophy. **Current Gene Therapy.**, v. 17, n. 4, p. 301-308, 2017.

WUILLÈME-TOUMI, S. *et al.* Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. **Leukemia.** v. 19, n. 7, p. 1248-52, 2005.

YELLON, D.M.; MARBER, M.S. Hsp70 in myocardial ischaemia. **Experimentia**, v. 50, p. 1075-1083, 1994.

YIU, E.; KORNBERG, A. Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 51, p. 759-64, 2015.

YONEKAWA, K.; HARLAN, J. M. Targeting leukocyte integrins in human diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 2, p. 129-40, 2005.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H. N.; LI, X. C.; KHAN, S. I.; BROEDEL JR., S. E.; RAULLI, R. E.; CIHLAR, R. L.; WALKER, L. A. Flavanone Glycosides from *Miconia trailii*. **Journal Natural Products**, v. 66, p. 39-41, 2003.

ANEXO A - PROTOCOLO DE DESIDRATAÇÃO, DIAFANIZAÇÃO E INCLUSÃO DOS TECIDOS

Desidratação:	
Álcool 50°	Pernoite
Álcool 60°	1 h
Álcool 70°	1 h
Álcool 80°	1 h
Álcool 90°	1 h
Álcool 100° (I)	1 h
Álcool 100° (II)	1 h
Diafanização:	
Xilol I	1 h
Xilol II	2 h
Inclusão:	
Parafina histológica I	Pernoite
Parafina histológica II	1 h
Parafina histológica III	Emblocagem

*A troca entre a parafina I e II ocorre dentro da estufa.

ANEXO B - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO – HEMATOXILA/ EOSINA

Filtrar hematoxilina e eosina	
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Álcool 100 %	3 minutos
Álcool 95 %	3 minutos
Álcool 70 %	3 minutos
H ₂ O torneira	3 minutos
Hematoxilina	10 segundos
H ₂ O corrente	10 minutos
H ₂ O destilada	3 banhos
Eosina	5 segundos
Álcool 95 %	Super rápido
Álcool I 100 %	2 trocas
Álcool II 100 %	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol montagem e colagem das lamínulas	*Colagem das lamínulas com permount
	*Deixar secar overnight

Observação:

Para o tecido fígado 50 segundos de hematoxilina e 5 segundos de eosina;

Para o tecido tibial cranial 20 segundos de hematoxilina e 5 segundos de eosina;

Para o tecido pulmão 20 segundos de hematoxilina e 5 segundos de eosina.

ANEXO C - PROTOCOLO DA REAÇÃO DE PICROSSIRIUS RED

Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Álcool 100 %	3 minutos
Álcool 95 %	3 minutos
Álcool 70 %	3 minutos
H ₂ O da torneira	3 minutos
Pcrossirius red	25 minutos
Álcool 95 %	Super rápido
Álcool I 100 %	2 banhos
Álcool II 100 %	2 minutos
Álcool-Xilol (1:1)	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilo II	2 minutos
Montagem Colagem das lamínulas	

**ANEXO D - PROTOCOLO DA SILANIZAÇÃO DAS LÂMINAS
ORGANOSILANO - 3' AMINOPROPYL - TRIETHOXYSILANE**

Preparação das lâminas com organosilano (estocar a 2 - 8°C) (Usar luvas)

- Lavar as lâminas com detergente a 10% (Extran MA 02 Neutro - Merck) diluído em água destilada - 10 a 20 min.

- Lavar em água corrente por 30 minutos.

- Lavar em álcool a 95%.

- Secar as lâminas uma a uma com pano limpo.

- Colocar na solução com silano.

- 1º cuba - organosilano a 4% (para muitas lâminas) ou 2% (para poucas lâminas) em acetona pura PA - 1 minuto.

- Retirar o excesso.

- 3º cuba - lavar em água destilada rapidamente.

- Secar em temperatura ambiente (de preferência) ou em estufa a 37°C por 3 horas.

ANEXO E - PROTOCOLO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Estufa 37 °C Overnight	
Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Álcool I 100 %	15 minutos
Álcool II 100 %	5 minutos
Álcool 95 %	5 minutos
Álcool 70 %	5 minutos
H ₂ O destilada	5 minutos
Tampão citrato – temperatura ambiente	5 minutos
Tampão citrato – temperatura 95 °C	30 minutos
Tampão citrato – temperatura ambiente	20 minutos
H ₂ O destilada – (sob agitação)	2 minutos
H ₂ O destilada –(parada)	2 minutos
Tampão PBS	5 minutos
Bloqueio Peroxidase endógena 3%	30 minutos
Tampão PBS (sob agitação) I	5 minutos
Tampão PBS (parado) II	5 minutos
Tampão PBS (parado) III	5 minutos
Secagem com papel filtro, contorno com caneta histológica ao redor dos cortes	
Protein block (Super Block) Temperatura ambiente	5 minutos
Anticorpo (AC) 1° -4° a 8° C	20 horas
Secagem AC 1°	

Rinsagem em tampão PBS Tampão PBS I (sob agitação)	5 minutos
Tampão PBS II (parado)	5 minutos
Tampão PBS III (parado)	5 minutos
Anticorpo (AC) 2° - Temperatura ambiente	30 minutos
Tampão PBS I (sob agitação)	5 minutos
Tampão PBS II (parado)	5 minutos
Tampão PBS III(parado)	5 minutos
Rinsagem H ₂ O destilada	
DAB (Chromogen Substrate Bulk Pack, SeyTek Laboratories)	2 minutos
Rinsagem H ₂ O destilada	
DAB (Chromogen Substrate Bulk Pack, SeyTek Laboratories)	2 minutos
H ₂ O destilada (sob agitação)	5 minutos
H ₂ O destilada (parado)	5 minutos
Hematoxilina	20 segundos
Água corrente	20 minutos
Álcool 70 %	2 minutos
Álcool 95 %	2 minutos
Álcool I 100%	2 minutos
Álcool II 100%	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos
Xilol III	Montagem *

Montagem das lâminas com lamínulas fixadas com permout.

Observação:

Para o tecido fígado 50 segundos de hematoxilina;

Para o tecido tibial cranial 20 segundos de hematoxilina;

Para o tecido pulmão 20 segundos de hematoxilina.