

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

DIMÍTRIOS VIDAL DE OLIVEIRA GARBIS

**O TRATAMENTO PROFILÁTICO COM EXTRATO PADRONIZADO DE
PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* AUMENTA A EXPECTATIVA DE VIDA DE
CAMUNDONGOS COM SEPSE EXPERIMENTAL POR MODULAÇÃO DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

SÃO LUÍS

2018

DIMÍTRIOS VIDAL DE OLIVEIRA GARBIS

O TRATAMENTO PROFILÁTICO COM EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS DE *Apis mellífera* AUMENTA A EXPECTATIVA DE VIDA DE CAMUNDONGOS COM SEPSE EXPERIMENTAL POR MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Médico.

Orientadora: Profa Dra Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

São Luís

2018

Vidal de Oliveira Garbis, Dimitrius.

O tratamento profilático com Extrato de Padronizado de Própolis de Apis Melifera aumenta a expectativa de vida de camundongos com sepse experimental por modulação da resposta inflamatória / Dimitrius Vidal de Oliveira Garbis. - 2018.

62 f.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.
Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2018.

1. Imunomodulação. 2. Macrófagos. 3. Própolis. 4. Sepse. I. Raquel Fernandes do Nascimento, Flávia. II. Título.

O TRATAMENTO PROFILÁTICO COM EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS DE *Apis mellífera* AUMENTA A EXPECTATIVA DE VIDA DE CAMUNDONGOS COM SEPSE EXPERIMENTAL POR MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Médico.

Orientadora: Professora Dra Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Lucilene Amorim Silva (Examinadora)

Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Rosane Nassar Meireles Guerra (Examinadora)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Ms. Alúcio da Silva Oliveira (Examinador)

Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

O final é acariciado com anúncios, anúncios estas de aprendizado, companheirismo, amadurecimento e mudanças. A formatura ou a transformação no ser profissional não representa o fim de uma etapa, mas o anúncio do começo do ser que transformado pela educação universaliza.

Do latim *UNIVERSATIS*, a Universidade veio construir o ser em sua totalidade, embora o sistema exerça sua influência distanciando os títulos e seus titulados da comunidade e criando barreiras sociais, ideológicas e geográficas.

Na Roma antiga “*persona*” eram as máscaras dos personagens de teatro, aqueles que eram capazes de ecoar o seu eu, em meio a representação de diversos personagens. Assim foi a minha construção na Universidade, a de um ator que em meio a busca pelo universo ecoou e ecoa vivências capazes de transformar.

Dessa forma, eu agradeço inicialmente a Deus pela oportunidade de estudar em uma instituição pública capaz de abrigar um universo de conhecimento, instituição essa que me acolheu, me respeitou e me transformou, eu não sairei daqui da forma que entrei.

Durante a minha formação, os meus professores desempenharam funções que me influenciam até hoje, dessa forma não poderia deixar de agradecer aos bons professores, que tratam com seriedade o bem público e universalizam o ser, se para Darcy Ribeiro a “crise na educação do Brasil não é uma crise é um projeto” eu agradeço a vocês que não se resignaram a esse projeto e me ensinaram o caminho da não resignação.

Agradeço aquelas que me alfabetizaram aos 4 anos a Tia Sayonara, a tia Marly e a Tia Conceição Freitas, a que mesmo com uma relação conflituosa me ensinou o amor pelos poemas e por escrever a tia Kite, aquelas que me pegaram pelo braço e acreditaram no meu potencial, tia Lu, Dona Keyla, Dona Lázara e Dona Marina. Agradeço também os professores do pré-vestibular no nome do professor Jaques que se tornou um amigo e um entusiasta acreditando no meu potencial. Na universidade, agradeço a professora Silma um dos meus primeiros contatos com a ciência e ao professor Marcus Paes que ministra suas aulas com um entusiasmo encantador e foi o primeiro a me questionar sobre questões sociais e políticas.

Agradeço aos professores que na sua simplicidade me fizeram compreender o papel do médico e me instigaram ao anseio por ser semelhante, Antônio Gonçalves, Conceição Pedrozo, Leopoldina, Adalgiza, Cristiana, Mônica, Marizelia, professores que como Paulo Freire “impregnaram de sentido o que fazem a cada instante”.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção” com essa citação de Paulo Freire eu agradeço a generosidade da minha orientadora, Professora Flávia. Generosidade por ser uma professora mãe, que cria possibilidades de conhecimento nos alavancando para o mundo. O convívio com a senhora é ímpar, a humildade, a paciência, o companheirismo, o estar do lado, todos esses adjetivos resumem na maestria com que desempenha seu papel de professora e cientista. Sem sombra de dúvidas eu fui agraciado por Deus pela oportunidade de convívio tão próximo com a senhora.

A Bíblia nos fala que a árvore é conhecida pelos frutos, o fruto do seu trabalho, professora Flávia, são bons. Dessa forma eu agradeço ao Laboratório de Imunofisiologia e aos que o constroem, professores Lucilene, Marcia, Ana Paula, Rosane e Wanderson. Aos hoje mestres do grupo da Sepse, Aluizio, Liana e Patricia, professores de excelência e comprometidos com a ciência. Aos alunos que foram a alma do LIF durante os meus dois anos de IC, Douglas, Lilian, Jefferson e André, vocês são profissionais incríveis. Agradeço ao Johnny e à Thiare por toda a paciência e companheirismo, por terem sempre a palavra para acalmar o coração aflito de um jovem IC. Não posso me esquecer daqueles que me acompanharam por 2 anos na Iniciação Científica, Camila e Ronaldo, obrigado por compartilharem as preocupações e o conhecimento. Agradeço também as instituições que financiaram esse projeto, FAPEMA, CNPQ e Apis Flora.

Em Provérbios 1:8-9 Deus nos fala sobre a importância de seguir as instruções dos pais e não desprezar os ensinamentos da mãe, pois serão um enfeite para nossa cabeça e um adorno para o pescoço. Eu agradeço meus pais por me ensinarem o respeito e a obediência, a juventude faz tudo parecer efêmero, mas a maturidade nos mostra o quão duro foi a construção de um ser. Eu nada seria sem as instruções firmes, silenciosas, muitas vezes com o olhar do meu pai e os ensinamentos diários da minha mãe. Obrigado pelo lar, pela família e pela educação, o caminho nem sempre foi de flores, mas sempre foi um caminho feliz, porque sempre estivemos juntos, grandes, eu, vocês, Geórgia e Silvana.

Agradeço aqueles que me acolheram no Maranhão, na Bíblia fala que quem tem muitos amigos pode chegar à ruína, mas existem amigos mais apegados que irmãos, agradeço Laerde por ter sido o primeiro a me acolher e me acompanhar incansavelmente os 6 anos da minha faculdade, agradeço também ao Fabricio, ter você é um presente diário, Bianca, Elis, Karina e José que me aguentaram também todos esses anos. Obrigado Gatas Lacrantes.

Agradeço e dedico esse trabalho ao Miguel. Eu sou incapaz de tornar escrito o meu sentimento de gratidão pela inspiração de ser que você representa para mim, dessa forma eu deixo um poema de Fernando Pessoa que é capaz de exprimir toda a sua grandiosidade.

Ao Miguel,

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

RESUMO

A própolis produzida pelas abelhas *Apis mellifera* é um material balsâmico resinoso, utilizado para a proteção da colmeia contra fungos, bactérias, vírus e insetos. Além das atividades antimicrobianas da própolis destaca-se o seu efeito antiinflamatório e imunomodulador. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF[®]) na infecção sistêmica induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) e seu efeito na polarização de macrófagos peritoniais de camundongos. Inicialmente, para avaliação da sobrevida, os camundongos Swiss foram separados em 5 grupos: SHAM, que não teve o ceco perfurado, CLP (Salina+CLP), CLP+ATB (Antibiótico+CLP), EPP10 (EPP-AF[®] 10mg/kg+CLP), EPP100 (EPP-AF[®] 100mg/kg+CLP). Todos os tratamentos foram feitos 6 horas antes do procedimento de perfuração e ligadura cecal. A sobrevida dos animais foi avaliada a cada 12 horas, durante 5 dias. Os dados demonstraram que houve um aumento de 51, 16 e 25% da expectativa de vida dos animais dos grupos CLP+ATB, EPP10 e EPP100, respectivamente, em relação ao grupo Controle. Após a avaliação da sobrevida, foram selecionados os grupos CLP e o EPP100 para avaliação de parâmetros imunofisiológicos. Após 12 horas da CLP, os animais foram eutanasiados e o material biológico foi colhido para as análises. Os dados demonstraram que o aumento da sobrevida previamente observado não foi decorrente da diminuição das unidades formadoras de colônia no peritônio e nem no sangue e pulmão uma vez que não houve diferença entre os grupos. Da mesma forma, não houve diferença na contagem de células do sangue periférico, da medula óssea e do peritônio. Também não houve diferenças no coagulograma (número de plaquetas, TTP e TTPA). Entretanto, é possível que o aumento da sobrevida seja decorrente de uma menor inflamação pulmonar uma vez que animais tratados com própolis tiveram melhor preservação do parênquima pulmonar com menos infiltrado inflamatório e menos hemorragia. Além disso, a glicemia também foi menor nos animais tratados com a própolis. Para investigar se o efeito da própolis poderia estar relacionado a uma ação moduladora na ativação de macrófagos, foi usado um ensaio in vitro usando macrófagos polarizados para os perfis M1 ou M2 de resposta. Os macrófagos foram extraídos e polarizados para macrófagos M1 com LPS 200ng/mL + IFN 10ng/mL e para macrófagos M2 com IL-4 40ng/mL e IL-13 20ng/mL. Após a polarização, o EPPAF foi adicionado na concentração de 100ug/mL. A própolis induziu a redução da produção de IL-10, MCP-1, TNF e IL-6 e o aumento de IFN- γ e IL-12, o EPPAF também reduziu a produção de NO. Em conclusão, o tratamento profilático com extrato padronizado de própolis aumenta a expectativa de vida de camundongos com sepse, muito provavelmente por sua capacidade de reduzir a inflamação pulmonar e por modular a resposta inflamatória, reduzindo citocinas inflamatórias e aumentando citocinas estimuladoras, o que poderia reverter a imunossupressão causada pela sepse, diminuindo assim a progressão deletéria da doença.

Palavras-chave: Própolis, CLP, sepse, imunomodulação, macrófagos

ABSTRACT

Propolis produced by Apis honey bee is a resinous balsamic material used to protect the hive against fungi, bacteria, viruses and insects. In addition to the antimicrobial properties of propolis, its anti-inflammatory and immunomodulatory effects are noteworthy. The objective of this study was to evaluate the effect of treatment with Standardized Propolis Extract (EPP-AF®) on systemic infection induced by cecal ligation and puncture procedure (CLP) and its effect on the polarization of mouse peritoneal macrophages. Initially, the Swiss mice were divided into 5 groups: SHAM, which did not have their cecum perforated; antibiotic treated CLP; PBS treated CLP; 10mg/kg EPP treated CLP; 100mg/kg EPP treated CLP. All received the treatment 6 hours prior to the cecal ligation and puncture procedure and survival was evaluated every 12 hours for 5 days. A sobrevivência dos animais foi avaliada a cada 12 horas, durante 5 dias. The data showed that there was an increase of 51, 16 and 25% of the life expectancy of the CLP + ATB, EPP10 and EPP100 groups, respectively, in relation to the Control group. At the second moment, the control group and the treated with PPE 100mg/kg were selected for evaluation of immunophysiological parameters. After 12 hours of infection the animals were euthanized and the biological material harvested for analysis. The data demonstrated that the increase in survival previously observed was not due to the decrease of the colony forming units in the peritoneum nor in the blood and lungs since there was no difference between the groups. Likewise, there was no difference in peripheral blood, bone marrow and peritoneum cell counts. There were also no differences in coagulogram (number of platelets, TTP and APTT). However, it is possible that the increase in survival is due to lower lung inflammation since animals treated with propolis had better preservation of the lung parenchyma with less inflammatory infiltrate and less hemorrhage. In addition, glycemia was also lower in animals treated with propolis. To investigate whether the effect of propolis could be related to a modulatory action on macrophage activation, an in vitro assay using polarized macrophages was used for the M1 or M2 response profiles. Peritoneal macrophages of 8 C57B1/6 mice, macrophages were extracted and polarized to M1 macrophages with LPS 200ng / mL + IFN 10ng / mL and to M2 macrophages with IL4 40ng / mL and IL13 20ng / mL. After the polarization the EPP-AF® was added at a 100ug/mL concentration to evaluate the effect of propolis on polarization. Regarding the inflammatory mediators, it was observed that the treatment with propolis induced the reduction of the production of IL-10, MCP-1, TNF E IL-6 and the increase of IFN- γ and IL-12, the EPP-AF® also reduced the production of NO in peritoneal macrophages. In conclusion, prophylactic treatment with standardized extract of propolis increases the life expectancy of sepsis mice, most probably because of its ability to reduce pulmonary inflammation and to modulate the inflammatory response, reducing inflammatory cytokines and increasing stimulatory cytokines, which could reverse the immunosuppression caused by sepsis, thus decreasing the deleterious progression of the disease.

Keywords: Inflammation; Propolis; Sepsis; Immunomodulation; macrophages

Lista de Figuras

- Figura 1 A resposta do hospedeiro à infecção e durante a sepse. Após a infecção, o patógeno invasor encontra o sistema imune inato (esquerda; "imunidade protetora"). Células imunológicas como os leucócitos e células do parênquima, como as células epiteliais e endoteliais estão envolvidas na resposta imune local precoce aos patógenos. Essas células percebem patógenos, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões intracelulares, incluindo receptores Toll-like (TLRs), oligomerização de ligação a nucleotídeos receptores semelhantes a domínios (NLRs; a ativação dos quais leva à formação de inflamassomas), indutíveis pelo ácido retinóico receptores semelhantes a genes (RLRs) e receptores de lectina do tipo C (CLRs). A esquerda temos a resposta normal e a direita quando sepse. (Adaptado de PALL et al, 2017). 24
- Figura 2. Modelos experimentais de sepse. (A) Ligadura e perfuração cecal, é o modelo de indução de sepse mais utilizado por maior semelhança ao quadro mais comum que acomete os humanos (Adaptado de BURAS et al, 2005). (B) Exemplo de administração exógena por via intraperitoneal, esse tipo de administração também pode ser feita por via intravenosa. Fonte: <http://procedureswithcare.org.uk/intraperitoneal-injection-in-the-mouse> 27
- Figura 3 Tricotomia realizada anterior a cirurgia com animais anestesiados..... 32
- Figura 4 Exposição do ceco para ligadura e perfuração..... 32
- Figura 5 Ligadura da válvula ileocecal..... 33
- Figura 6. Perfuração do ceco com agulha de calibre 18G..... 33
- Figura 7 Abdômen suturado em ponto simples separado..... 34
- Figura 8. Sobrevida de animais com sepse letal induzida por CLP. Camundongos Swiss foram distribuídos em 5 grupos: SHAM (os animais passaram pelo processo cirúrgico, sem perfuração do ceco, receberam soro fisiológico estéril 0,9% de reanimação), CLP (receberam soro fisiológico estéril 0,9% e passaram por CLP), CLP+ATB (foram tratados com antibiótico de amplo espectro (Imipenem) na dose de 5mg/kg e passaram por CLP), EPP10 (foram tratados com dose única do EPP-AF®, na dose de 10 mg/kg e passaram por CLP), EPP100 (foram tratados com dose única do EPP-AF®, na dose de 100 mg/kg e passaram por CLP). Todos os tratamentos foram realizados por via subcutânea, 6 horas antes do procedimento cirúrgico. Os animais foram acompanhados durante 5 dias em intervalos de 12/12 horas (n = 25)..... 39
- Figura 9 Efeito do tratamento profilático com Própolis sobre as Unidades formadoras de Colônia (CFU) em animais com sepse induzida por CLP. Os animais receberam o tratamento profilático com EPP100, 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. (A) CFU peritônio; (B) CFU sangue; (C) CFU pulmão. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo própolis. 41
- Figura 10 Efeito do tratamento profilático com Própolis na glicemia de animais com sepse induzida por CLP. Os animais receberam o tratamento profilático 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. Peróxido. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo própolis. *p<0,05 em relação ao controle. 42
- Figura 11 Efeito do tratamento profilático com Própolis nas plaquetas, TAP, TTPA, RNI . Os animais receberam o tratamento profilático com EPP100 6 horas antes da indução da Sepse

por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. (A) Plaquetas; (B) TTPA; (C) TAP (D) RNI. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo tratado.	43
Figura 12 Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do sangue periférico (A) e da medula (B). Os animais receberam o tratamento profilático 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. A contagem total dessas células foi feita 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP.....	44
Figura 13 Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do lavado peritoneal. Os animais receberam o tratamento profilático 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. A contagem total dessas células foi feita 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP.....	45
Figura 14 Efeito do tratamento profilático com própolis em animais com sepse induzida por CLP A – fotomicrografia do ceco do grupo CLP B- fotomicrografia do ceco do grupo tratado. C- fotomicrografia do pulmão do grupo CLP D- fotomicrografia do pulmão do grupo tratado. Os animais do grupo controle receberam PBS e o grupo tratado recebeu EPPAF 100 6 horas antes da indução da sepse por CLP, os órgãos foram retirados, colocados em formol e enviados para o histopatológico, a análise das lâminas foram feitas de modo que o patologista desconhecesse os grupos.....	46
Figura 15 Produção de óxido nítrico em macrófagos polarizados tratados com própolis. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BI/6 foram polarizados para M1 (IFN- γ 10ng/mL+ LPS 200 ng/mL ou M2 (IL-10 40ng/mL+ IL-13 20ng/mL e tratados ou não com EPPAF (100 μ g/mL) durante 24 horas. A produção de NO foi avaliada usando o reagente de Griess. *p<0,05 em relação ao grupo não tratado com própolis.	47
Figura 16 Produção de citocinas por macrófagos tratados com própolis. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BI/6 foram polarizados para M1 (IFN- γ 10ng/mL+ LPS 200 ng/mL ou M2 (IL-10 40ng/mL+ IL-13 20ng/mL e tratados ou não com EPPAF (100 μ g/mL) durante 24 horas. Após este tempo o sobrenadante foi coletado e as citocinas IL-10 (A), MCP-1 (B) IFN- γ (C), TNF-a (D), IL-12 (E) e IL-16 (F) foram dosadas por CBA. *p < 0,05 em comparação ao controle.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Critérios de SIRS	18
Tabela 2. Critérios e respectivas pontuações para o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). O SOFA avalia parâmetros como respiração, coagulação, fígado, função cardiovascular, sistema nervoso central e rins. Para cada parâmetro são dispostos critérios e sinais que são atribuídos de uma determinada pontuação que varia de 0 a 4. Quanto maior for a pontuação do paciente no SOFA, maior será a probabilidade de morte.....	20
Tabela 3 Critérios clínicos do score quickSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment).....	21
Tabela 4. Expectativa de vida de animais com sepse letal induzida por CLP e que receberam tratamento profilático com extrato de própolis (EPP10 e EPP100) 6 horas antes da CLP.....	40
Tabela 5 Resultado da análise do histopatológico, o material foi coletado 12 horas após a indução da sepse. O grupo controle recebeu tratamento com PBS e o grupo tratado recebeu tratamento com EPP100, os valores são referentes a média por grupo e desvio padrão. .	46

Lista de Abreviaturas

APCs	Células apresentadoras de antígenos (do inglês <i>Antigen Presenting Cells</i>)
ATB	Antibiótico
ATP	Adenosina trifosfato
CBA	Citometria por esferas ordenadas (do inglês <i>Cytometric Beads Array</i>)
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CLP	Ligadura e perfuração cecal, (do inglês <i>Cecal Ligadure and Puncture</i>)
DAMPS	Padrões moleculares associados ao dano
DHR	Dihydrorhodamine
DNA	Deoxyribonucleic acid
EPP-AF[®]	Extrato Padronizado de Própolis
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
H₂O₂	Peróxido de Oxigênio
IL	Interleucina
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína 1, quimiotática de monócitos (do inglês <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MFI	Intensidade de fluorescência média (do inglês <i>Mean Florescence Intensity</i>)
MHC-II	Complexo principal de Histocompatibilidade Classe II (do ingles <i>Major Histocompatibility Complex class II</i>)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-Kb	Nuclear fator kappa B
NK	Natural Killer
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PGE2	Prostaglandina E2
PMA	Acetato de Miristato de Forbol (do inglês, <i>Phorbol Myristate Acetate</i>)
qSOFA	<i>quick Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
RPM	Rotações por minuto
RRP	Receptores de Reconhecimento de Padrões

SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TLR	Receptor Toll-like
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Sepses.....	17
2.2 Dados epidemiológicos da Sepses	21
2.3 Imunopatologia da sepses	22
2.4 Modelos experimentais de sepses	26
2.5 Terapia para Sepses	27
2.6 Potencial biológico da própolis	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Extrato de Própolis Padronizado (EPP-AF®).....	31
4.2 Animais	31
4.3 Indução da sepses por Ligadura e perfuração cecal (CLP).....	32
4.4. Delineamento experimental.....	34
4.5. Avaliação da sobrevivência dos animais	35
4.6. Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC)	35
4.7 Avaliação de Parâmetros Imunofisiológicos.....	35
4.7.1 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos	35
4.7.2 Contagem das células da medula óssea.....	36
4.7.3 Obtenção e contagem das células peritoneais	36
4.7.4. Histopatológico	36
4.8 Experimento <i>In Vitro</i> de polarização de macrófagos	36
4.8.1 Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	37
4.8.2. Determinação de citocinas	37
4.9 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 O extrato de própolis aumenta a sobrevivência de camundongos com sepses letal induzida por CLP.	39
5.2 Extrato de própolis não interfere nas Unidades formadoras de colônia em camundongos com sepses letal induzida por CLP.....	40
5.3 O extrato de própolis diminui a glicemia de camundongos com sepses letal induzida por CLP.	42

5.5 O extrato de própolis não altera o percentual de células sanguíneas em camundongos com sepse letal induzida por CLP.	43
5.6 O extrato de própolis não altera o número de células peritoneais em camundongos com sepse letal induzida por CLP.	44
5.7 O extrato de própolis não altera a inflamação no foco primário da infecção, mas inibe a inflamação no pulmão de camundongos com sepse letal induzida por CLP.	45
5.8 A própolis modula a polarização de macrófagos in vitro.....	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	62
ANEXO I	62

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome de anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas induzidas por uma infecção não controlada. Devido a sua alta mortalidade e elevados custos é uma das maiores preocupações de saúde pública, com gastos de 20 bilhões de dólares nos Estados Unidos, em 2011. A complexidade do quadro dificulta o estudo clínico, bem como, a terapêutica que ao longo dos anos vem sofrendo mudanças com a avaliação de novas evidências (SINGER et al, 2016).

A padronização da indução da sepse experimental contribuiu para que nas últimas décadas a compreensão sobre o mecanismo fisiopatológico da sepse aumentasse, mas esse conhecimento precisa ser traduzido em novas estratégias terapêuticas, a fim de diminuir a mortalidade dessa grande síndrome. Dessa forma, iniciou-se a busca de uma classe de medicamentos que atue de forma imunomoduladora e que diminua a inflamação exacerbada que ocorre durante a sepse (KWAK et al., 2000). Neste contexto, a própolis se tornou alvo de interesse na pesquisa de processos infecciosos sistêmicos.

A produção da própolis se dá a partir de substâncias e exsudatos existentes nos vegetais, diante a isso a sua composição pode se diferenciar quando comparamos sua composição quando essa é obtida de diferentes regiões. (PARK et al, 1998). Além disso é adicionado secreções próprias, obtendo assim um material maleável e balsâmico, capaz de proteger a colmeia frente aos agentes agressores, como fungos, bactérias, vírus, insetos, dentre outros. De modo geral, estão presentes na composição da própolis os compostos flavonoides, como quercetina, aromadendrina, pinocebrina, etc., compostos fenólicos, com destaque para o artepellina C, baccharina e drupanina, no caso da própolis verde, além de ácidos como p-cumárico, caféico, ferúlico, benzoico (LEITÃO et al, 2004). As evidências científicas atribuem aos compostos fenólicos a eficácia contra fungos, bactérias e vírus, os flavonoides exercem função bactericida por meio de ação na parede celular (COWAN, 1999). Para fins de imunomodulação há uma maior correlação com os compostos fenólicos (FUNARI et al., 2006).

A hipótese deste trabalho é que a própolis de *Apis mellífera* pode ser usada como imunomodulador e melhorar o quadro geral na sepse em modelo experimental induzido por ligadura e perfuração cecal e que esta capacidade estaria associada com sua capacidade de induzir a polarização de macrófagos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sepses

Historicamente, pode-se dividir a o conhecimento sobre sepses em 4 grandes marcos, inicialmente aquele proposto ainda na Grécia antiga, que define “sepsis” como a decomposição de matéria orgânica na presença de bactérias, definição essa que perdurou por 2700 anos, quando finalmente surge a teoria dos germes, em que o patógeno era causa única do quadro séptico. Com o avanço da microbiologia e da farmacologia evidenciava-se que a terapia específica ao patógeno não era garantia sucesso terapêutico, surgindo assim teorias multifatoriais que relacionam patógeno e a resposta do hospedeiro a nível molecular, celular, tecidual e orgânico (GEROULANOS e DOUKA, 2006).

Evidentemente, a sepses permanece um grande desafio, tanto para os cientistas quanto para o manejo clínico. Com elevada taxa de mortalidade, 20-30%, as limitações sobre o conhecimento da fisiopatologia da doença por vezes levaram a condutas equivocadas (SILVA et al, 2013). A fim de definir critérios clínicos para um diagnóstico precoce, prevenção e redução da mortalidade, especialistas se reuniram em 1991 para elaborarem o primeiro consenso.

O primeiro consenso deu ênfase ao processo contínuo de severidade da síndrome, com um quadro evolutivo de sepses, evoluindo para sepses severa induzida por hipotensão e choque séptico, o estágio mais grave (GEROULANOS e DOUKA, 2006). Foi estabelecido nesse consenso a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, a fim de desenvolver critérios clínicos para identificação do quadro séptico (BALK et al, 2014). Os critérios foram desenvolvidos a fim de facilitar o diagnóstico proporcionando uma intervenção clínica precoce, visto que isso aumentaria a sobrevivência. Dessa forma determinaram que: temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36, frequência cardíaca maior que 90bpm, frequência respiratória maior que 20 rpm ou sinais de hiperventilação identificado por uma PaCO₂ menor que 32mmHg, alterações na contagem dos leucócitos numa faixa maior que 12.000 ou menor que 4.000 cel/mm³ ou a presença de 10% de neutrófilos imaturos. Com 2 desses critérios mais uma cultura positiva ou um foco infeccioso caracteriza-se a sepses (BALK et al, 2014).

Tabela 1. Critérios de SIRS

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)			
Temperatura corporal	Frequência Cardíaca	Frequência respiratória / Hiperventilação	Leucócitos
>38C ou <36C	>90	> 20 rpm PaCO ₂ < 32mmHg	>12.000 cel/m ³ ou < 4.000 cel/mm ³ ou 10% de neutrófilos imaturos

Fonte: Adaptado de BALK et al (2014).

O segundo consenso de sepse não apresenta novas definições, visto a falta de evidências para novas definições. No entanto, foram desenhados caminhos para as mudanças que aconteceram no consenso de 2016 que diante da necessidade do diagnóstico precoce para o sucesso da intervenção médica e com o objetivo de avaliar e atualizar as definições para sepse e choque séptico, uma força tarefa com 19 profissionais especialistas nos aspectos clínicos e fisiopatológicos da doença atualizaram e lançaram o Terceiro Consenso Internacional de Definição para Sepse e choque séptico (SINGER et al, 2016).

A sepse passou a ser definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a infecção. Em quadros mais graves, os quais exista problemas de perfusão, anormalidades metabólicas e celulares são profundas a ponto de aumentar a mortalidade passa a se caracterizar como Choque séptico (SINGER et al, 2016).

Anteriormente, 2 critérios de SIRS com a presença do agente infeccioso caracterizava a sepse. O novo consenso admite que a sepse envolve resposta pró inflamatória e anti-inflamatória do hospedeiro e que fatores ambientais também influenciam. GEROULANOS et al em 2006 para falar da influência que fatores externos exerciam sobre a doença propôs uma comparação semelhante a um canal de comunicação, o qual o organismo, em nível celular e molecular seria o canal e as citocinas a mensagem formando assim um complexo sistema que reage de forma diferente a estímulos semelhantes.

Além disso, questionava-se a alta sensibilidade e baixa especificidade dos critérios de SIRS para o diagnóstico de sepse, visto que diversos outros quadros como trauma, queimaduras desenvolviam quadro clínico semelhante e outros pacientes em franca falência orgânica que

não apresentam critérios para SIRS, demonstrando sua ineficiência no diagnóstico (SINGER et al, 2016).

O Sepsis-3 delimita também a definição de choque séptico, colocando-o como um subconjunto de anormalidades consequentes do metabolismo circulatório e celular que aumentam a mortalidade, enfatiza também o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), um sistema de pontuação amplamente utilizado em Unidades de Terapia Intensiva para avaliar disfunção orgânica e prognóstico como um importante parâmetro para avaliar pacientes sépticos (SINGER et al, 2016).

Tabela 2. Critérios e respectivas pontuações para o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). O SOFA avalia parâmetros como respiração, coagulação, fígado, função cardiovascular, sistema nervoso central e rins. Para cada parâmetro são dispostos critérios e sinais que são atribuídos de uma determinada pontuação que varia de 0 a 4. Quanto maior for a pontuação do paciente no SOFA, maior será a probabilidade de morte.

Pontuação sequencial de avaliação de falha de órgão (sepse) ^a					
Sistema	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Respiração					
PaO ₂ /FiO ₂ mmHg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.6) com suporte respiratório	<100 (13.3) com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, x 10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Fígado					
Bilirrubina, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2 – 1.9 (20 – 32)	2.0 – 5.9 (33 – 101)	6.0 – 11.9 (102 – 204)	>12 (204)
Cardiovascular	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamina <5 ou Dobutamina (qualquer dose) ^b	Dopamina 5.1 – 15 ou Epinefrina ≤ 0.1 Ou Norepinefrina ≤ 0.1 ^b	Dopamina > 15 ou Epinefrina > 0.1 Ou Norepinefrina > 0.1 ^b
Sistema nervoso central					
Pontuação escala de Glasgow	15	13-14	10 – 12	6 – 9	<6
Renal					
Creatinina, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2 – 1.9 (110 – 170)	2.0 – 3.4 (171 – 299)	3.5 – 4.9 (300 – 400)	>5.0 (440)
Saída de urina, mL/d				<500	<200

Abreviações: FiO₂ Fração de inspiração de oxigênio, PAM: pressão arterial média PaO₂: Pressão parcial de oxigênio.

^a Adaptado de Vincent (2015).

^b Doses de catecolaminas dadas com ug/kg/min por pelo menos 1 hora

^c Pontuação escala de Glasgow Coma varia de 3 a 15; Maior pontuação indica melhor função neurológica.

Fonte: adaptado de SINGER et al., (2016).

Além da ênfase no SOFA, foi proposto uma nova ferramenta o quickSOFA (qSOFA) que passa a ser recomendado como teste de cabeceira. O q-SOFA é um índice clínico que deve ser usado em pacientes com suspeita de infecção a fim de identificar quais estão mais propensos a maior gravidade do quadro. O qSOFA é composto pela frequência respiratória, estado mental e pressão arterial (Tabela 3) e quando 2 dos 3 critérios são preenchidos, há maior probabilidade desse paciente estar com sepse (SINGER et al, 2016).

Tabela 3 Critérios clínicos do score quickSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment)

Critério quickSOFA (qSOFA)
Frequência respiratória ≥ 22/minutos
Alteração mental
Pressão arterial sistólica ≤ 100 mm/Hg

Fonte: Adaptado de American Medical Association, 2016.

Em metanálise recente em que se compara o q-SOFA com os critérios de SIRS, concluiu-se que os critérios de SIRS foram significativamente superiores para o diagnóstico de sepse e o q-SOFA teve melhores resultados quando avaliado mortalidade (SERAFIM et al, 2017), evidenciando a dificuldade na elaboração de um protocolo capaz de identificar precocemente os pacientes suscetíveis a sepse assim como avaliar o prognóstico desses pacientes.

2.2 Dados epidemiológicos da Sepse

A sepse é a segunda causa de morte entre pacientes internados em UTIs não coronarianas e é a décima causa de mortalidade no geral (AJROUCHE et al., 2013). Porém, acredita-se que esses números sejam subestimados visto a ausência de uma base de dados em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (FLEISCHMANN et al., 2015). Estima-se que entre os anos de 1995 e 2015, por estudos com dados de países desenvolvidos, a incidência de casos de sepse foi de 437 casos para cada 100.000 habitantes ao ano. (FLEISCHMANN et al., 2015). Nos Estados Unidos, entre 2005 e 2014, a cada 1000 pacientes admitidos para internação hospitalar, 18,6 tinham critérios clínicos para sepse e a mortalidade foi de 51%, dados esses similares à Classificação Internacional de Doenças (ICD 9ª edição). A maior expectativa de vida da população mundial associada às melhores condições socioeconômicas e intervenções mais eficazes em condições de alta mortalidade, tais como, infarto agudo do miocárdio, acidente

vascular cerebral e as neoplasias malignas, contribuem para o aumento da incidência e prevalência da Seps e suas condições relacionadas (AJROUCHE et al., 2014).

A etiologia da infecção é objeto de estudo, visto que esta pode variar em função de características específicas do ambiente. Nos Estados Unidos, de 1979 a 1987 houve o predomínio de bactérias gram-negativas causadores de seps. No corte subsequente de 1988 a 2000 houve o predomínio de 52,1% de infecções por gram-positivas, 37,6% de gram-negativas, 4,7% polimicrobianos, 1% anaeróbicos e 4,6% por fungos (MARTIN, 2012).

Em um estudo em Unidades de Terapia Intensiva envolvendo 14.000 pacientes, foi constatado que das culturas positivas, 62% eram gram-negativas, 47% eram gram-positivas e 19% eram fungos. Dentre as gram-positivas foram encontrados mais frequentemente *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Já entre as gram-negativas, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Pseudomonas aeruginosa* foram os principais agentes etiológicos na cultura (VINCENT, 2015).

Mais recentemente, um estudo com 6.843.279 pacientes com seps, 3.226.406 pacientes tiveram o resultado da cultura negativo. Foi constatado que pacientes com cultura negativa apresentaram um maior índice de comorbidades e disfunções (respiratória, cardíacas, hepáticas, disfunção renal e uma mortalidade de 34,6% se comparado com os de cultura positiva 22,7%), dessa forma, a cultura negativa na seps está relacionada com uma maior disfunção aguda e mortalidade, sendo um preditivo independente de morte (GUPTA et al, 2016).

2.3 Imunopatologia da seps

Após a infecção, o patógeno é reconhecido pelo sistema imune inato do hospedeiro via padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) por meio de uma variedade de padrões receptores de reconhecimento (PRRs). Na maioria dos casos, a resposta imune inata elimina o patógeno invasor, mas às vezes o patógeno prevalece e a resposta do hospedeiro pode se tornar desequilibrada e prejudicial (ANGUS e VAN DER POLL, 2013). Em pacientes com seps o sistema imune saiu da homeostase em duas direções opostas, mostrando sinais tanto de inflamação excessiva quanto de imunossupressão, cuja extensão varia entre os indivíduos. O conhecimento da trajetória da resposta do hospedeiro durante a seps é limitado; na maioria dos estudos que investigam a disfunção imunológica, as primeiras medições foram feitas no momento da admissão na unidade de terapia intensiva (UTI) e, portanto, não fornecem informações sobre a direção e o curso do tempo da resposta do hospedeiro antes o

reconhecimento clínico da doença grave (TAKEUSHI et al, 2010). Durante a sepse, a resposta do hospedeiro é ainda mais perturbada devido à liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). As moléculas associadas a danos (DAMPs) podem ativar muitos dos PRRs que também reconhecem os PAMPs, dando origem a um ciclo vicioso que envolve ativação imunológica sustentada e disfunção orgânica. A supressão imunológica envolve os sistemas imunológico adaptativo e inato e é caracterizada pela apoptose de células T, células B e células dendríticas (DCs), o esgotamento de células T, a expansão de células T reguladoras e populações de células supressoras derivadas de células mielóides (MDSC) e a reprogramação células apresentadoras de antígenos levando à redução da expressão de HLA-DR e uma capacidade diminuída de produzir pró-inflamatórios citocinas. Embora os neutrófilos contribuam claramente para a inflamação induzida pela sepse, eles também apresentam características disfuncionais que prejudicam suas capacidades antimicrobianas. Os principais achados na sepse são a apoptose tardia dos neutrófilos e a aparecimento de neutrófilos imaturos no sangue periférico, que apresentam déficits nas funções efetoras antimicrobianas, incluindo capacidade de ruptura oxidativa. Pacientes com sepse têm um número aumentado de MDSCs, que são células mielóides imaturos que podem impedir resposta imune adequada, particularmente a função das células T. TH2, T-Helper (VAN DER POLL et al, 2017).

A similaridade entre as reações inflamatórias induzidas por diferentes patógenos e aquelas provocadas por diferentes tipos de lesão, infecciosas ou não infecciosa podem ser explicadas pela interação entre os PRRs com diversos PAMPs e DAMPs que é o caminho comum dessas reações (Figura 1). Devido ao rápido reconhecimento e melhores cuidados terapêuticos e de suporte, muitos pacientes com sepse sobrevivem nos primeiros dias após a admissão na UTI e desenvolvem uma doença crítica crônica que foi denominada inflamação persistente e imunossupressão (VAN DER POLL et al, 2017).

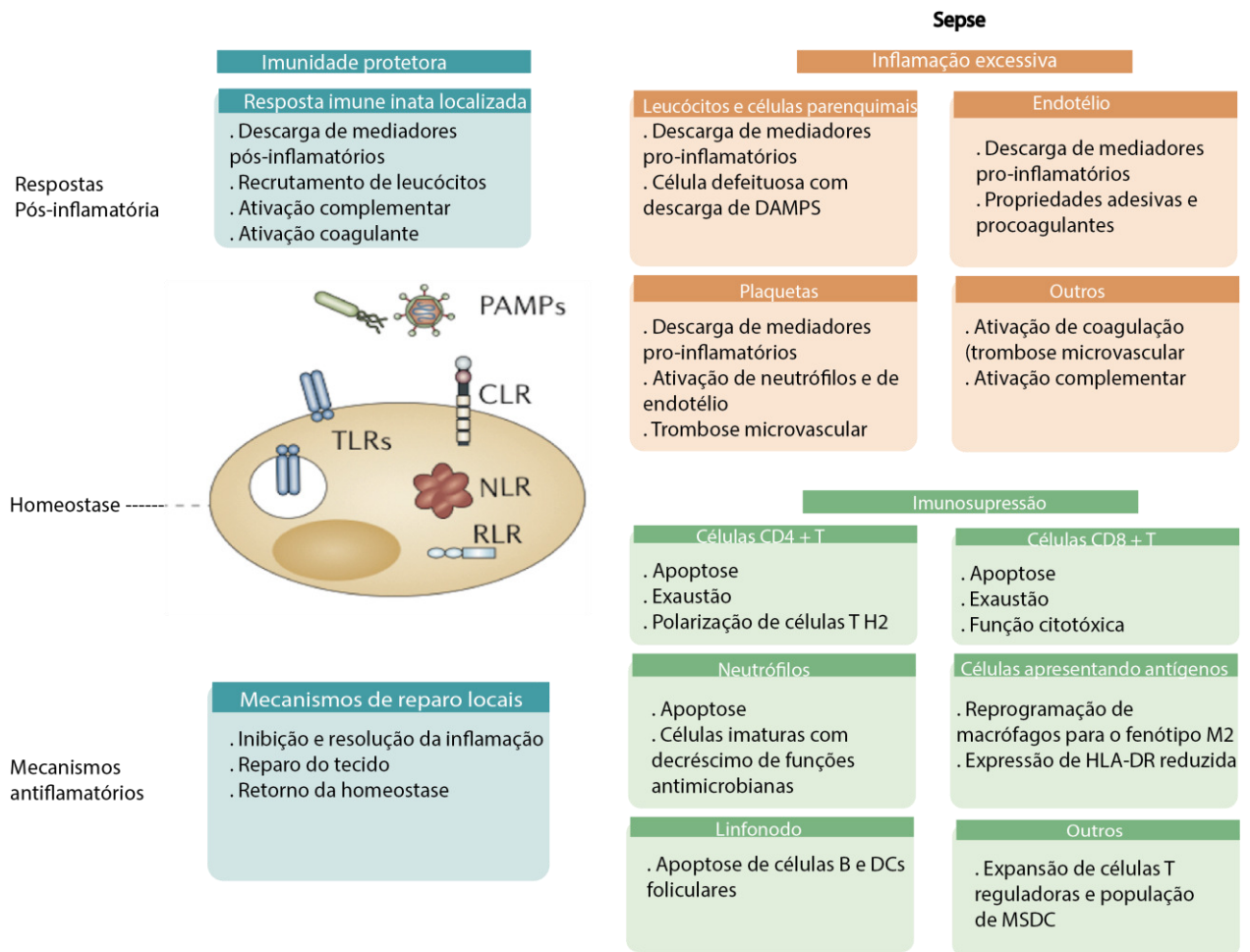


Figura 1 **A resposta do hospedeiro à infecção e durante a sepse.** Após a infecção, o patógeno invasor encontra o sistema imune inato (esquerda; "imunidade protetora"). Células imunológicas como os leucócitos e células do parênquima, como as células epiteliais e endoteliais estão envolvidas na resposta imune local precoce aos patógenos. Essas células percebem patógenos, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões intracelulares, incluindo receptores Toll-like (TLRs), oligomerização de ligação a nucleotídeos receptores semelhantes a domínios (NLRs; a ativação dos quais leva à formação de inflamassomas), indutíveis pelo ácido retinóico receptores semelhantes a genes (RLRs) e receptores de lectina do tipo C (CLRs). A esquerda temos a resposta normal e a direita quando sepse. (Adaptado de VAN DER POLL et al, 2017).

Os mediadores pró inflamatórios como, por exemplo, as citocinas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) - 1, IL-12, e IL-18 exercem papel importante no quadro agudo de sepse (WIERSINGA et al, 2014) e influenciam diretamente na ativação do sistema complemento, particularmente C3a e C5a os quais têm potente ação pró inflamatória e importante ação de recrutamento e ativação de leucócitos e plaquetas. Na verdade, existem ligações claras entre coagulação e inflamação; o fator tecidual e os fatores de coagulação FVIIa, FXa, trombina e fibrina podem induzir a sinalização celular pró-inflamatória, em grande parte via receptores ativados por protease. A tendência a trombose durante a sepse é aumentada também pela atividade comprometida concomitante as três principais vias anticoagulantes: antitrombina, inibidor da via do fator tecidual e o sistema da proteína acontecendo de forma

disseminada e levando a trombozes microvasculares, hemorragia, agravando o dano endotelial e consumindo plaquetas.

A imunossupressão se caracteriza pela exaustão dos linfócitos e a reprogramação dos apresentadores de antígenos (VAN DER POLL et al, 2017). Essa exaustão e apoptose de linfócitos T-CD4, T-CD8, linfócitos B e células dendríticas foi demonstrado em estudos pós morte, no qual, pacientes que morreram por sepse, além de menor quantidade dessas células no baço, suas células produziram menores quantidades de interferon-gamma (IFN)- γ e TNF- α comparado a pacientes que morreram por causas não infecciosas (HOTCHKISS e KARL, 2013). Estudos experimentais demonstraram que há redução da expressão de HLA-DR (MHC de classe II) em monócitos e macrófagos, diminuindo assim sua capacidade na secreção de citocinas pró-inflamatórias e um aumento de secreção IL-10 (citocina tipicamente anti-inflamatória) durante a sepse (SCUMPIA et al, 2005). Outro fator que contribui para a imunossupressão é a disfunção fagocitária dos neutrófilos, um aumento de apoptose e o aparecimento de células imaturas as quais apresentam um aumento da função oxidativa contribuindo para o dano tecidual (VAN DER POLL et al, 2017). Outros fatores que contribuem para uma exacerbada resposta além características do patógeno como virulência e carga parasitária são as características inerentes do hospedeiro como o ambiente inserido, fatores genéticos, idade, outras doenças associadas, medicamentos em uso (ANGUS e VAN DER POLL, 2013).

As manifestações clínicas da sepse, tais como febre, hipercoagulação e hipotensão periférica estão diretamente relacionadas ao perfil de citocinas inflamatórias e mediadores inflamatórios tais como: IL (interleucina) -1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1) (BURKOVSKIY et al., 2013).

O controle da progressão da infecção depende muito do estado de ativação da imunidade inata, em especial, de neutrófilos e macrófagos. A erradicação de microrganismos pelos neutrófilos e macrófagos depende em grande parte da sua capacidade fagocítica (SEGAL et al., 2005) e posterior geração de espécies reativas de oxigênio durante o “burst” respiratório. Suas ações são descritas como uma faca de dois gumes uma vez que contribuem para o recrutamento e *clearance* do agente infeccioso, porém a exacerbção da sua resposta, com uma elevada liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, culminam por induzir lesão tecidual do quadro séptico (KORISH et al, 2011).

Os metabólitos produzidos pelos fagócitos são secretados no interior do fagossomo por uma série de reações iniciadas pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase, que produz formas ativas de oxigênio incluindo os radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, fundamentais na eliminação de bactérias fagocitadas (MILLER e CHO, 2011; KOBAYASHI e DELEO, 2013).

Para a ativação da capacidade fagocítica dos macrófagos, é fundamental a participação de linfócitos T auxiliares (CD4+), que após a apresentação de antígenos pelos macrófagos, via MHC de classe II, também se ativam, proliferam e secretam citocinas, como por exemplo IFN- γ e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), que irão atrair mais macrófagos ativados para o sítio da infecção e assim, debelar a infecção (KOBAYASHI e DELEO, 2013; MILLER e CHO, 2011).

A Interleucina 6 (IL-6) desempenha um papel dual no quadro séptico, sendo classificada tanto como uma citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória e está correlacionada com a sepse bacteriana. A IL-6 já foi descrita como um importante marcador para gravidade do quadro. Além disso, desempenha uma importante função na diferenciação dos Linfócitos T-helper e parece ser crucial na produção de fatores teciduais. Em trabalhos experimentais de sepse, esta encontra-se elevada da mesma forma que a Interleucina 10 que exerce um papel anti-inflamatório (BURKOVSKIY et al, 2013).

2.4 Modelos experimentais de sepse

Diversos modelos experimentais de sepse são descritos na literatura e muito do conhecimento da fisiopatologia da sepse é decorrente destes modelos, principalmente os estudos feitos em camundongos. Entre os principais modelos podemos citar os que acontecem por meio da administração exógena de um patógeno, seja por via endovenosa ou inoculação direta em cavidade peritoneal da bactéria viva como a *E. coli* ou de componentes microbianos como o Lipopolissacarídeo (LPS) que são capazes de mimetizar os quadros da sepse, esses modelos simulam o quadro clínico mais comum em humanos. Porém, o modelo de injúria com liberação da flora bacteriana como o de ligação e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture – CLP*) é o que mais se assemelha ao quadro humano decorrente de traumas em alças intestinais como colite, ou peritonite pós-operatória (BENJAMIM et al, 2002) adicionando assim mais validade clínica (BURAS et al, 2005).

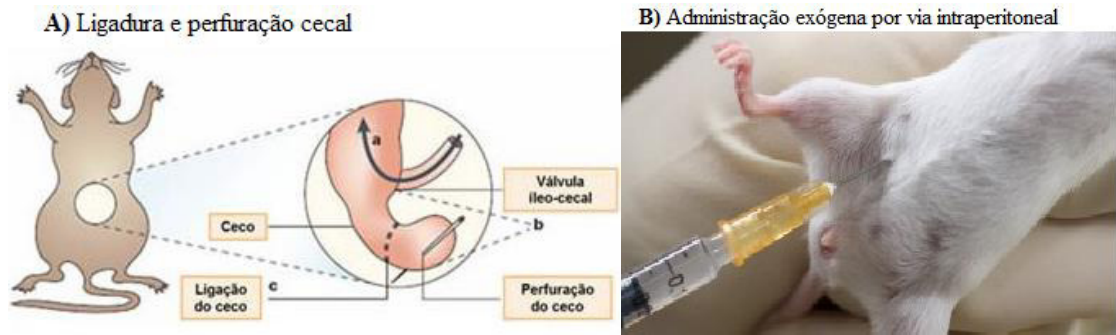


Figura 2. Modelos experimentais de sepse. (A) Ligadura e perfuração cecal, é o modelo de indução de sepse mais utilizado por maior semelhança ao quadro mais comum que acomete os humanos (Adaptado de BURAS et al, 2005). (B) Exemplo de administração exógena por via intraperitoneal, esse tipo de administração também pode ser feita por via intravenosa. Fonte: <http://procedureswithcare.org.uk/intraperitoneal-injection-in-the-mouse>

2.5 Terapia para Sepse

A sepse é um desafio tanto para cientistas que pesquisam o seu mecanismo, quanto para o corpo clínico que conduzirá os pacientes. Como já descrito, desde a teoria dos germes, o tratamento instituído foi a antibioticoterapia (MAYR et al, 2014).

O fármaco a ser utilizado dependerá de diversos fatores como foco infeccioso, isolamento do germe e condições inerentes do paciente que influenciam no metabolismo e secreção do medicamento, como função renal, função hepática e toxicidade cardiovascular (PENG et al, 2012).

Porém, mesmo na vigência de terapia específica contra o agente infeccioso a mortalidade continua entre 20 e 30% (SINGER et al, 2016), mostrando que além do agravamento da síndrome acontecer de forma rápida, nem sempre a resposta terapêutica é adequada visto que a regulação imunológica se encontra comprometida (MAYR et al, 2014).

Dessa forma, torna-se necessário a busca por medicamentos capazes de modular essa resposta imunológica deletéria ao organismo.

2.6 Potencial biológico da própolis

A própolis é cada vez mais popular e amplamente utilizada em alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos devido a suas propriedades popularmente conhecidas (GARDANA et al., 2012).

Em termos de composição, a própolis é geralmente composta de 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e outras 5% de substâncias que incluindo minerais e ácidos fenólicos (cinâmico e o cafeíco), ou seus estéres, flavonoides, terpenóides, esteroides,

açúcares e aminoácidos (BANKOVA, 2005) sendo influenciada ainda pelas características ambientais como tipo de vegetação, estação do ano e do entorno da colmeia (BARLAK et al., 2011). Isso influencia não só sua composição, mas também sua ação e potencial farmacológico (KUMAZAWA et al., 2004)

Diversos estudos têm demonstrado ações biológicas e farmacológicas de diferentes amostras de própolis de todo o mundo (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013). Já foi descrito que a própolis exerce efeito no tratamento de infecções virais, antisséptico (KUJUMGIEV et al., 1999), bacterianas e fungicas.

Uma das própolis que tem sido amplamente utilizada na medicina popular, é a própolis verde. Própolis verde é um material elaborado pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, que fragmentam ápices vegetativos de *Baccharis dracunculifolia*, utilizada popularmente no tratamento da tuberculose, de úlcera duodenal, de distúrbios gástricos, na redução da febre, contra doenças inflamatórias, como analgésico, anticancerígeno, bem como por sua atividade antimicrobiana (SFORCIN et al., 2001; SALATINO et al., 2005).

O efeito imunomodulador da própolis verde foi investigado por Bachiega et al. (2012) quanto a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 por macrófagos intraperitoneais, e induzidos por LPS antes e após tratamento com própolis e com os compostos isolados ácido p-cumárico e cinâmico. A própolis e os ácidos estimularam a produção de IL-1 β , enquanto a produção de IL-6 foi significativamente inibida após a incubação com própolis (5, 50 e 100 μ g/poço) e os ácidos p-cumárico e cinâmico (50 e 100 μ g/poço). No protocolo de desafio do macrófago com lipopolissacarídeos (LPS), os ácidos inibiram eficientemente a produção de IL-6 após a incubação com o estímulo, enquanto a própolis inibiu nas duas condições, antes e após a incubação. O mesmo comportamento sendo observado com a IL-10. A própolis modulou a resposta imune/inflamatória de acordo com a concentração empregada, sendo que na concentração de 25 μ g/poço, houve aumento da produção de IL-6 enquanto na concentração de 50 μ g/poço, houve diminuição. Mostrando que a própolis pode se comportar como pró ou antiinflamatória conforme a dose (FORTES, 2017).

A ação anti-inflamatória da própolis tem sido relatada por várias pesquisas usando diferente modelos de inflamação (HU et al., 2005; PAULINO et al., 2008; TAN-NO et al., 2006; XUAN et al., 2011). A administração de 200mg/kg e em curto período de tempo inibe a produção de IFN- γ em cultura de esplenócitos murino (ORSATTI et al., 2010), além disso o aumento no tempo de tratamento em C57Bl/6, inibe a produção de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2 E

IL-10 em esplenócitos, sugerindo atividade anti-inflamatória uma vez que estas citocinas compõem as características da inflamação crônica de várias doenças (MISSIMA et al., 2010).

Alguns compostos de própolis verde, como o éster feniletil do ácido cafeíco (CAPE) têm mostrado efeito na supressão da síntese de prostaglandinas e leucotrienos por macrófagos (BORRELLI et al., 2002). Entretanto, a administração oral do extrato de própolis aumenta a produção de leucotrienos e prostaglandinas por macrófagos peritoneais (MIRZOEVA; CALDER, 1996). Além do CAPE, a artepelinina C demonstrou efeito anti-inflamatório e analgésico em modelo experimental de inflamação por carragenina após tratamento oral ou intraperitoneal (PAULINO et al., 2008). A atividade anti-inflamatória também foi observado por Machado et al. (2012), na inibição de citocinas próinflamatórias e aumento de citocinas inflamatórias, e possivelmente este efeito pode estar relacionado a presença destes compostos no extrato de própolis verde.

A respeito da atividade antimicrobiana da própolis, muitos trabalhos têm descrito a atividade antibacteriana em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* (FARNESI; JONG; BASTOS, 2009). *In vitro*, a própolis tem ação direta em microrganismos e *in vivo* pode estimular a resposta imunológica, ativando mecanismos envolvidos na morte de microrganismos (CAPOCI et al., 2015; DE CASTRO et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a eficácia do tratamento profilático com extrato padronizado de própolis (EPPAF) em camundongos com sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento profilático do Extrato Padronizado de Própolis (EPPAF) sobre os seguintes parâmetros de animais submetidos à sepse induzida por CLP:
 - Sobrevida de camundongos.
 - Contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) no lavado peritoneal, sangue e lavado bronco-alveolar (BAL).
 - Número de células da medula óssea e do sangue de animais submetidos a CLP.
 - Número de células no infiltrado inflamatório no peritônio
 - Número de plaquetas, Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) nos animais submetidos a CLP.
 - Glicemia
 - Inflamação no ceco e pulmão
- Avaliar o efeito do Extrato Padronizado de Própolis (EPPAF) sobre a polarização de macrófagos peritoneais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato de Própolis Padronizado (EPP-AF®)

O extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* foi produzido a partir de uma mistura composta por matéria prima de própolis obtida das regiões Sul e Sudeste do Brasil, majoritariamente por própolis verde, de acordo com Berreta (2013).

O extrato padronizado de própolis foi produzido industrialmente pela Apis Flora Ltda. (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Resumidamente, a própolis foi mantida a -20°C, durante 12 h, e em seguida triturada para obtenção de um pó fino. Esse pó foi submetido a técnicas extrativas utilizando com solução hidroalcoólica (7:3), com maceração dinâmica, durante 72 h, à temperatura ambiente. A solução foi submetida à percolação e depois à filtração, utilizando, no primeiro passo, a biomassa de própolis e, filtro de linha, respectivamente. O extrato de própolis resultante apresentou 11% p/v de matéria seca e composição química padronizada qualitativa e quantitativamente por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC).

O extrato mole de própolis, obtido após a evaporação de todo o solvente, foi dissolvido em óleo de rícino etoxilado – 40 OE (Kollidon - Basf®), a 37°C, por 2h, na proporção de 1:1.

Para o tratamento dos animais o extrato foi diluído em solução salina tamponada com fosfato PBS (1%). A dose e/ou concentrações utilizadas nos ensaios foram baseadas em estudos prévios (HORI et al., 2013).

4.2 Animais

No estudo foram usados camundongos da linhagem Swiss, fêmeas com idade entre 8 a 14 semanas, oriundos do Biotério Central da UFMA para os ensaios in vivo e camundongos da linhagem C57Bl/6, fêmeas, com idade entre 8-14 semanas, oriundos do CEMIB para o ensaio in vitro. Eles foram mantidos com livre acesso à ração e à água durante todo o estudo, e submetidos a ciclos de luz/escuridão de 12 horas. Cada camundongo fora submetido aos estudos na mesma hora do dia para minimizar influências circadianas. O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovado com número de protocolo 23115.003819/2016-11 (Anexo A).

4.3 Indução da sepse por Ligadura e perfuração cecal (CLP)

Os animais foram anestesiados com uma solução anestésica 2:1, Cloridrato de Ketamina (25 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (20 mg/kg) por via intramuscular.



Figura 3 Tricotomia realizada anterior a cirurgia com animais anestesiados.



Figura 4 Exposição do ceco para ligadura e perfuração.

A infecção polimicrobiana foi induzida pela ligadura e perfuração cecal (CLP), abaixo da válvula ileocecal.



Figura 5 Ligadura da válvula ileocecal.

O ceco foi perfurado dez vezes com agulha de calibre 18 G, induzindo a sepse letal (MACIEL et al., 2008) e foi levado de volta para a cavidade peritoneal.



Figura 6. Perfuração do ceco com agulha de calibre 18G.

Após este procedimento, o peritônio e o abdômen foram suturados com ponto simples separado.



Figura 7 Abdômen suturado em ponto simples separado.

Todos os animais receberam 0,5mL/10g de peso do animal de soro fisiológico estéril após o procedimento cirúrgico por via subcutânea, como fluido de ressuscitação, com a finalidade de prevenir a hipotensão pós-operatória (WICHTERMANN et al., 1980; BAKER, 1983; BENJAMIM et al., 2002).

4.4. Delineamento experimental

Inicialmente, os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=5 animais/grupo): SHAM (os animais passaram pelo processo cirúrgico, sem perfuração do ceco, receberam soro fisiológico estéril 0,9% de reanimação), CLP (receberam soro fisiológico estéril 0,9% e passaram por CLP), CLP+ATB (foram tratados com antibiótico de amplo espectro (Imipenem) na dose de 5mg/kg e passaram por CLP), EPP10 (foram tratados com dose única do EPP-AF®, na dose de 10 mg/kg e passaram por CLP), EPP100 (foram tratados com dose única do EPP-AF®, na dose de 100 mg/kg e passaram por CLP). Todos os tratamentos foram realizados por via subcutânea, 6 horas antes do procedimento cirúrgico.

4.5. Avaliação da sobrevida dos animais

Para a análise da sobrevida, os animais (n = 25) foram observados durante 5 dias após o procedimento cirúrgico (CLP), e a mortalidade foi calculada considerando o tempo médio de sobrevivência (MST) e o aumento percentual no tempo de vida (ILS), de acordo com a seguinte fórmula (GUPTA et al., 2000):

$$\text{ILS (\%)} = \frac{(\text{MST of the treated group} - \text{MST of the control group}) \times 100}{\text{MST of the control group}}$$

4.6. Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC)

Para a quantificação de bactérias no sangue, lavado peritoneal, pulmão foram coletados 10µL do exsudato e feita diluição em 1:10 e 1:100. Em seguida, estas diluições foram semeadas em placas de Petri em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI). A semeadura foi realizada com auxílio de alça de Drigalski para espalhamento uniforme da alíquota. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, por 24h, para crescimento de colônias bacterianas.

4.7 Avaliação de Parâmetros Imunofisiológicos

Após a obtenção dos dados da sobrevida, foi selecionada a dose de própolis de 100mg/kg para realizar novo experimento onde foram usados apenas dois grupos: CLP e EPP100. Todas as análises foram realizadas 12 horas após a CLP, quando os animais foram eutanasiados utilizando a associação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (25 mg/kg) (RIOS et al., 2017).

4.7.1 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os animais foram anestesiados com uma solução de 2:1 de ketamina a 5% (Vetanarcol®) (25 mg/kg) e xilazina a 2% (Rompum®) (20 mg/kg) via intramuscular.

As amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção retro-orbital e o sangue transferido para tubos cônicos contendo Citrato de Sódio 3,8% na proporção de 9 partes de sangue para 1 de anticoagulante. Os parâmetros hematológicos (leucócitos diferencial e plaquetas) foram determinados por técnicas manuais segundo Oliveira (2007). Os esfregaços foram corados com a utilização do kit Instant Prov (Newprov).

Para obtenção do soro os tubos com sangue foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos, para determinação de Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastia Parcial

Ativada (TTPA), foi utilizado o kit TP (Bioclin) e TTPA (Bioclin), de acordo com instruções do fabricante. A determinação da glicose capilar foi realizada por punção caudal, após a anestesia do animal e foi utilizado o aparelho portátil (glicosímetro) OneCallPlus.

4.7.2 Contagem das células da medula óssea

As células da medula óssea foram obtidas da seguinte forma: o fêmur foi perfundido com 1 mL de PBS. Para determinar o número total de células, nove volumes da solução de células foram adicionados a 1 volume de cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30%. As células foram contadas com auxílio de um hemocitometro (Sigma) em microscópio óptico de luz comum.

4.7.3 Obtenção e contagem das células peritoneais

As células peritoneais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 2 mL de solução tamponada de fosfato (PBS) estéril gelada. Para a determinação do número total, as células peritoneais foram coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1. As células foram contadas com auxílio de um hemocitometro (Sigma, St. Louis, MO, USA). A contagem diferencial foi realizada com auxílio da Cytospin e as células foram coradas com auxílio do kit InstantProv (Newprov, Pinhais, Brazil). A contagem das células foi feita com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

4.7.4. Histopatológico

Para a análise histopatológica, o ceco e os pulmões foram fixados em formol a 10% e embebidos em parafina. Em seguida, secções de 5 µm de espessura foram cortadas em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz com objetivos de 20, 40 e 100×. Os seguintes parâmetros foram analisados: a presença de congestão vascular, edema, infiltrado inflamatório e hemorragia. As alterações teciduais foram pontuadas como: 0 para ausente, 1 para escasso, 2 para moderado e 3 para intenso (LIBERIO et al., 2011).

4.8 Experimento *In Vitro* de polarização de macrófagos

Para o experimento *in vitro* foi realizado o lavado peritoneal com 5 mL de PBS estéril em 8 animais. Para determinar o número total de células, nove volumes da solução de células

foram adicionados a 1 volume de cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30%. As células foram contadas com auxílio de um hemocitometro (Sigma) em microscópio óptico de luz comum. Foi adquirido a proporção de 75 a 80% de macrófagos em relação a linfócitos. Foi feito o plaqueamento em placa de 96 poços na concentração de 2×10^5 no meio RPMI a 2%, em quadruplicatas.

O tempo de adesão celular foi de 2 horas, lavou 3 vezes com PBS estéril e acrescentou o meio RPMI a 2%. Para polarização foi utilizado LPS 200ng/ml IFN- γ 10ng/mL para macrófagos M1 (M1) e para macrófagos M2 (M2) IL-4 40ng/mL e IL-13 20ng/mL. Após o estímulo foi adicionado EPPAF na concentração de 100ug/mL.

Após 48 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados para avaliação da produção de óxido nítrico e citocinas conforme descrito abaixo.

4.8.1 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

Após a incubação e indução da polarização, o sobrenadante foi recolhido e incubado em volume igual (50 μ L) com reagente de Griess (1% de sulfanilamida / 0,1% de naftalenodiamina / 2,5% de H_3PO_4), durante 10 min, à temperatura ambiente. Para quantificar a acumulação de nitrito a absorbância foi determinada a 550 nm. A conversão da absorbância em mM de NO foi feita por regressão linear a partir da curva padrão obtida com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (5-60 mM) em meio RPMI (DING et al., 1988).

4.8.2. Determinação de citocinas

O sobrenadante das culturas de células peritoneais foram coletados e armazenados a -20°C até o ensaio. IL-6, IL-10 e IL-12p70, MCP-1, IFN- γ , TNF foram quantificados por kit de citocinas do tipo "Cytometric Bead Array" (CBA) (Mouse Th1/Th2/Th17), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences). Sete populações de partículas chamadas de "beads", com distintas intensidades de fluorescência detectada em FL3 e conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, foram incubadas com alíquotas de soro ou padrão e com anticorpo de detecção conjugado com Ficoeritrina (PE) detectado em FL2 para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para o ensaio foram preparados com: 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de beads e 50 μ L do reagente de detecção Th1/Th2/Th17 PE (Mouse Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent/1 vial, 4mL). O mesmo procedimento será realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos serão homogeneizados e incubados por duas horas, em temperatura ambiente, no escuro, conforme orientações do fabricante. Os resultados foram

adquiridos por citometria de fluxo com FACScalibur (BD) e analisados utilizando-se o software CellQuest (BD).

4.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPadPrism 5.0. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Após constatada normalidade pelo teste D'Agostino-Pearson, as variáveis numéricas foram submetidas à análise da variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ou a two-way ANOVA. Para os dados de sobrevida, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank para análise estatística. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$) (SOKAL; ROHLF, 1996).

5. RESULTADOS

5.1 O extrato de própolis aumenta a sobrevivência de camundongos com sepse letal induzida por CLP.

O uso profilático de extrato de própolis protege os animais da sepse letal induzida por CLP (Figura 8). Os grupos EPP10 e EPP100 apresentaram um aumento na sobrevivência quando comparados ao grupo CLP, sendo o aumento na expectativa de vida de 16,7% e 25%, respectivamente, quando comparados ao grupo CLP (Tabela 4).

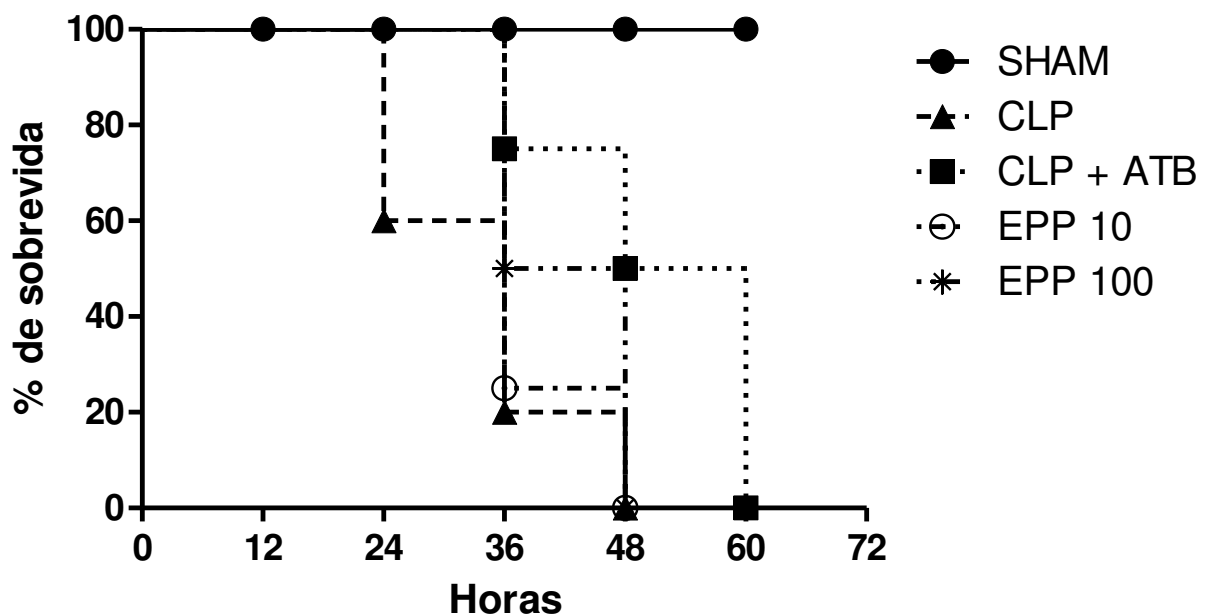


Figura 8. Sobrevivência de animais com sepse letal induzida por CLP. Camundongos Swiss foram distribuídos em 5 grupos: SHAM (os animais passaram pelo processo cirúrgico, sem perfuração do ceco, receberam soro fisiológico estéril 0,9% de reanimação), CLP (receberam soro fisiológico estéril 0,9% e passaram por CLP), CLP+ATB (foram tratados com antibiótico de amplo espectro (Imipenem) na dose de 5mg/kg e passaram por CLP), EPP10 (foram tratados com dose única do EPP-AF®, na dose de 10 mg/kg e passaram por CLP), EPP100 (foram tratados com dose única do EPP-AF®, na dose de 100 mg/kg e passaram por CLP). Todos os tratamentos foram realizados por via subcutânea, 6 horas antes do procedimento cirúrgico. Os animais foram acompanhados durante 5 dias em intervalos de 12/12 horas (n = 25).

Tabela 4. Expectativa de vida de animais com sepse letal induzida por CLP e que receberam tratamento profilático com extrato de própolis (EPP10 e EPP100) 6 horas antes da CLP.

Tratamento	MST (Horas)^a	ILS (%)
Salina	33,6	-
ATB	51	51
EPP 10	39	16
EPP 100	42	25

^a MST median survival time; ^bILS: increase life-span

5.2 Extrato de própolis não interfere nas Unidade formadoras de colônia em camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Apesar de aumentar a sobrevida dos animais, o tratamento profilático com própolis não altera as unidades formadoras de colônia no peritônio (Figura 9A), sangue (Figura 9B) e pulmão (Figura 9C).

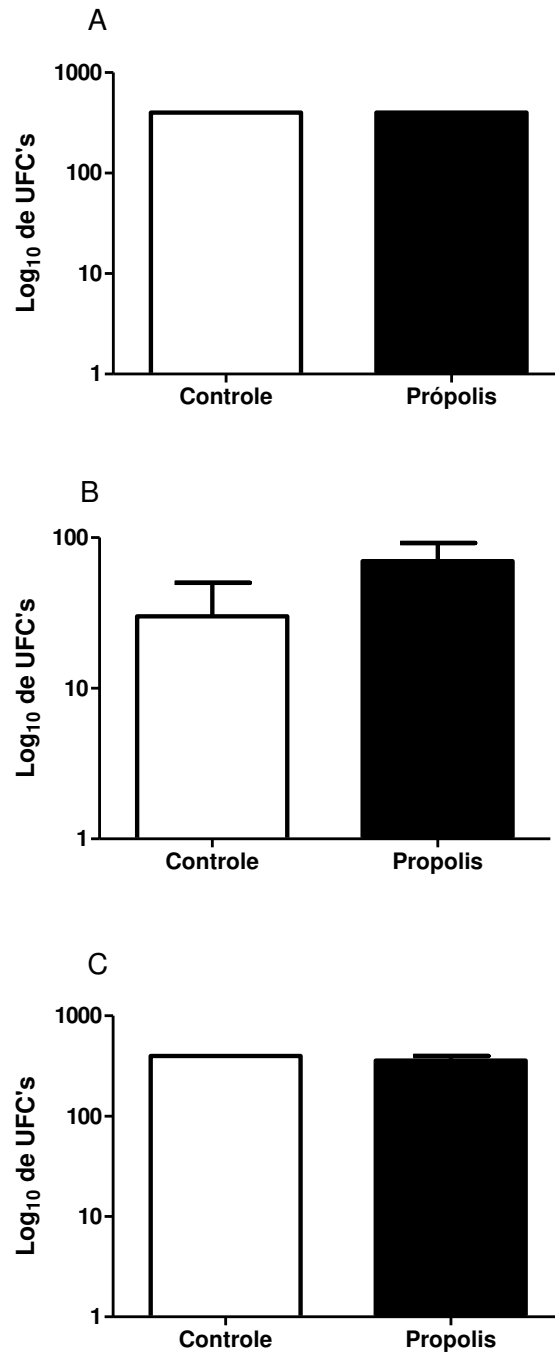


Figura 9 Efeito do tratamento profilático com Própolis sobre as Unidades formadoras de Colônia (CFU) em animais com sepse induzida por CLP. Os animais receberam o tratamento profilático com EPP100, 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. (A) CFU peritônio; (B) CFU sangue; (C) CFU pulmão. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo própolis.

5.3 O extrato de própolis diminui a glicemia de camundongos com sepse letal induzida por CLP.

O tratamento profilático com própolis reduziu a glicemia dos animais quando comparado ao grupo controle, sendo a média do grupo própolis de 18 mmol/L e a do grupo controle de 42 mmol/L (Figura 10).

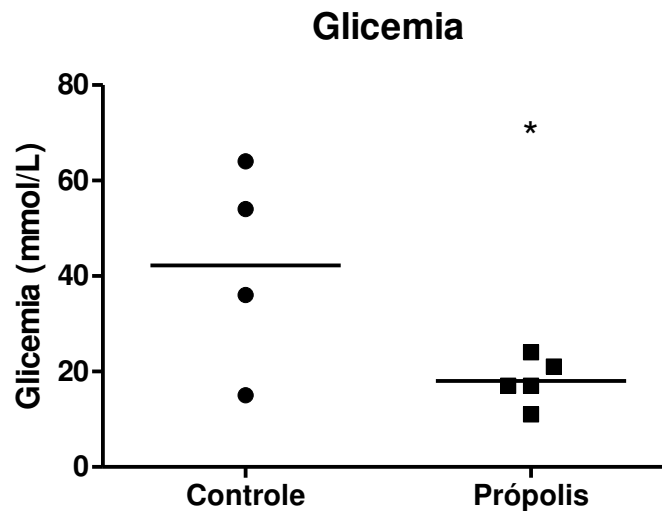


Figura 10 Efeito do tratamento profilático com Própolis na glicemia de animais com sepse induzida por CLP. Os animais receberam o tratamento profilático 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. Peróxido. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo própolis. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

5.4. O extrato de própolis não altera os parâmetros de coagulação de camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Não houve diferença entre os grupos quanto ao número de plaquetas (Figura 11A), bem como em relação ao TTPA (Figura 11B), TAP (Figura 11C) e Relação normatizada internacional (RNI) (Figura 11D).

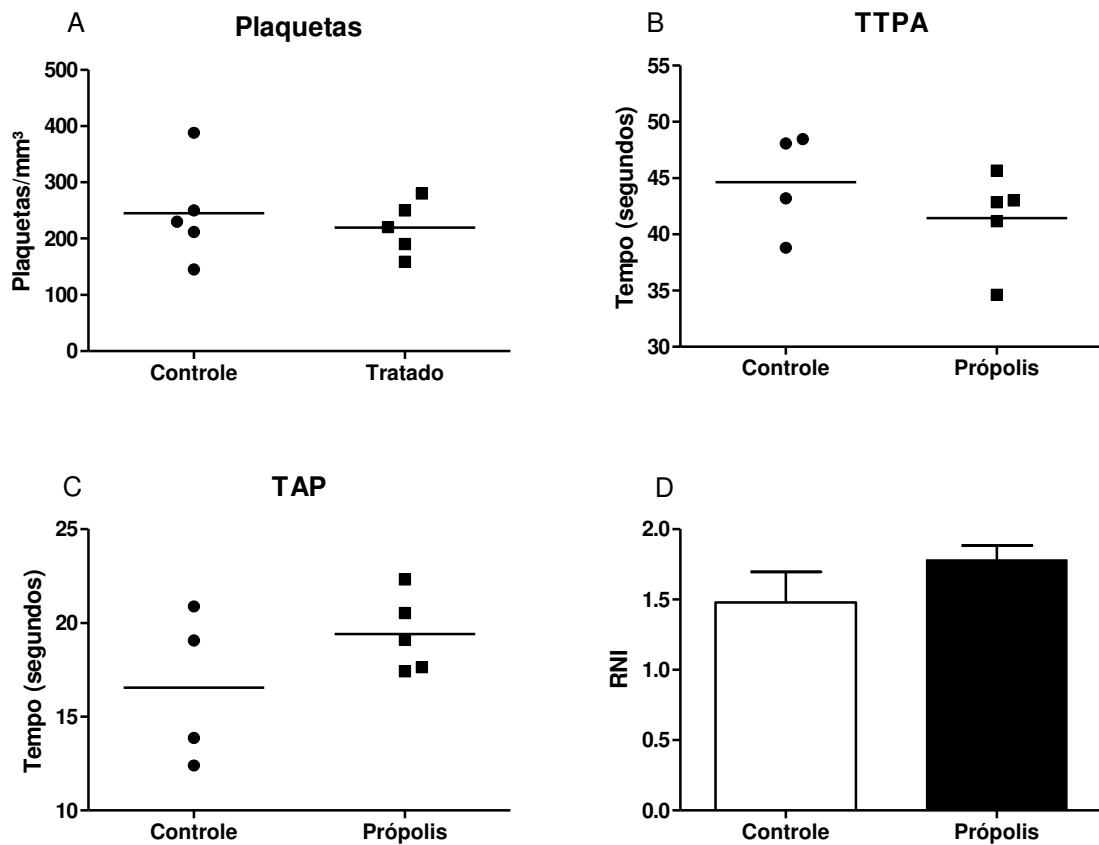


Figura 11 Efeito do tratamento profilático com Própolis nas plaquetas, TAP, TTPA, RNI . Os animais receberam o tratamento profilático com EPP100 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. (A) Plaquetas; (B) TTPA; (C) TAP (D) RNI. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo tratado.

5.5 O extrato de própolis não altera o percentual de células sanguíneas em camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Para avaliar se o tratamento com própolis poderia causar alguma alteração hematológica, foi realizada a contagem diferencial do sangue. Não houve diferença no percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos entre os grupos controle (CLP) e própolis (Figura 12A). Da mesma forma, não houve alterações na contagem de células da medula óssea quando os dois grupos foram comparados (Figura 12B)

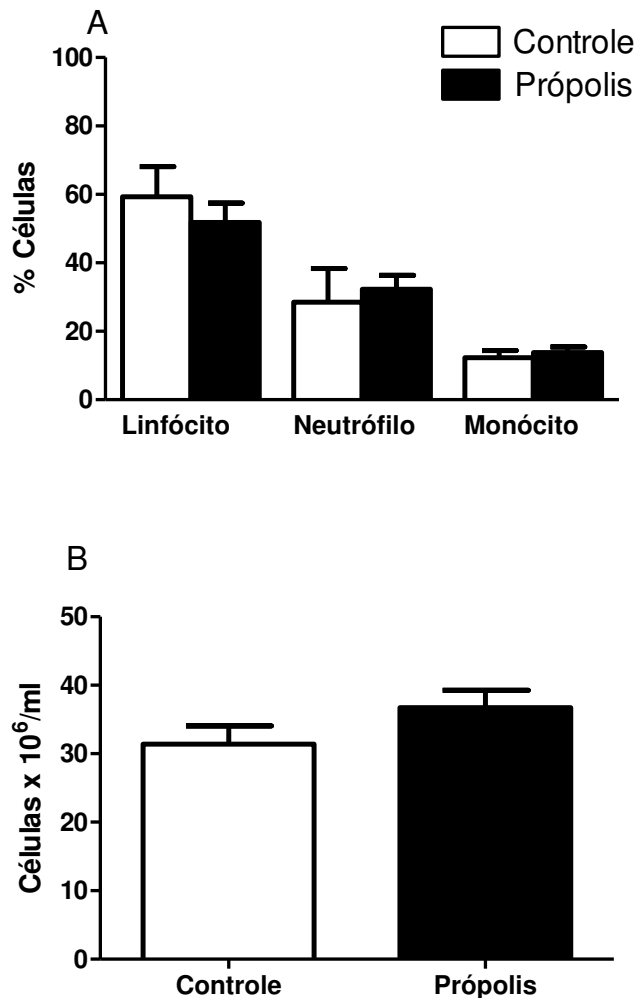


Figura 12 Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do sangue periférico (A) e da medula (B). Os animais receberam o tratamento profilático 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. A contagem total dessas células foi feita 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP.

5.6 O extrato de própolis não altera o número de células peritoneais em camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Sabendo que o recrutamento de células inflamatórias ao foco da infecção é importante para o controle da disseminação bacteriana, foi avaliado o infiltrado inflamatório na cavidade peritoneal. Entretanto, a própolis não induziu alteração significativa em relação a contagem total de células no sítio da infecção e nem em relação ao número de macrófagos e eosinófilos, embora pareça exercer influência no número de macrófagos, linfócitos e monócitos essa diferença não foi significativa (Figura 13).

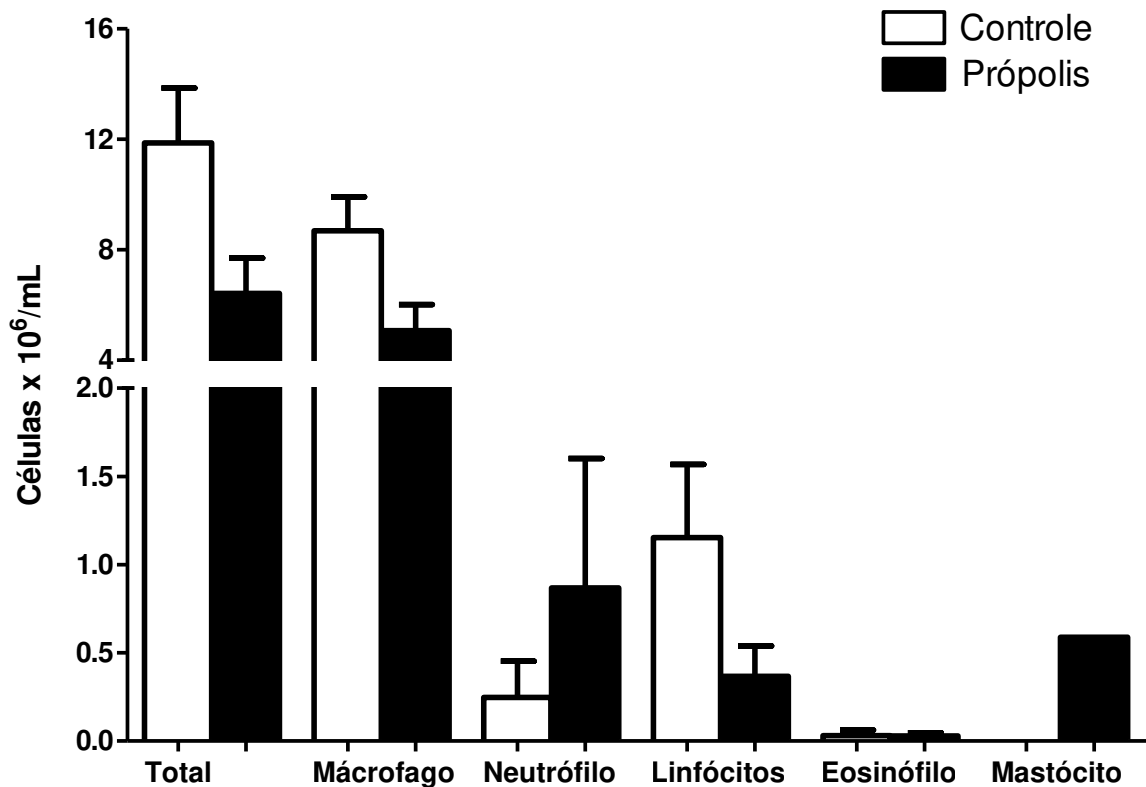


Figura 13 Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do lavado peritoneal. Os animais receberam o tratamento profilático 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. A contagem total dessas células foi feita 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP.

5.7 O extrato de própolis não altera a inflamação no foco primário da infecção, mas inibe a inflamação no pulmão de camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Da mesma forma que a própolis não alterou o infiltrado inflamatório no foco da infecção, também não foi observada diferença no ceco entre os animais que receberam tratamento com própolis e o grupo controle, ambos os grupos apresentaram grande degradação tecidual. Entretanto, a própolis induziu uma redução na hemorragia e da necrose, bem como uma forte tendência de diminuição no infiltrado inflamatório e no edema no pulmão dos animais com sepse (Tabela 5 e Figuras 14 A-D).

Tabela 5 Efeito do tratamento profilático com própolis sobre a inflamação no ceco e pulmão de animais com sepse induzida por CLP. Resultado da análise do histopatológico do material coletado 12 horas após a indução da sepse. O grupo controle recebeu tratamento com PBS e o grupo tratado recebeu tratamento com EPP100. O ceco e o pulmão foram coletados de 2 animais de cada grupo, a avaliação estatística foi feita utilizando o teste t não paramétrico.

	Ceco		Pulmão	
	Controle	Própolis	Controle	Própolis
Hemorragia	1 ± 0,7	3 ± 0,7	3 ± 0,07	1 ± 0,07*
Infiltrado	2 ± 0,7	3 ± 0,7	3 ± 0,7	1 ± 0,7
Necrose	1 ± 0,01	1 ± 0,01	2 ± 0,007	0 ± 0,007*
Edema	2 ± 0,007	2 ± 0,7	3 ± 0,7	1 ± 0,07

*p<0,05 em relação ao grupo controle

0 = ausência; 1 = Leve; 2 = moderado; 3 = Intenso.

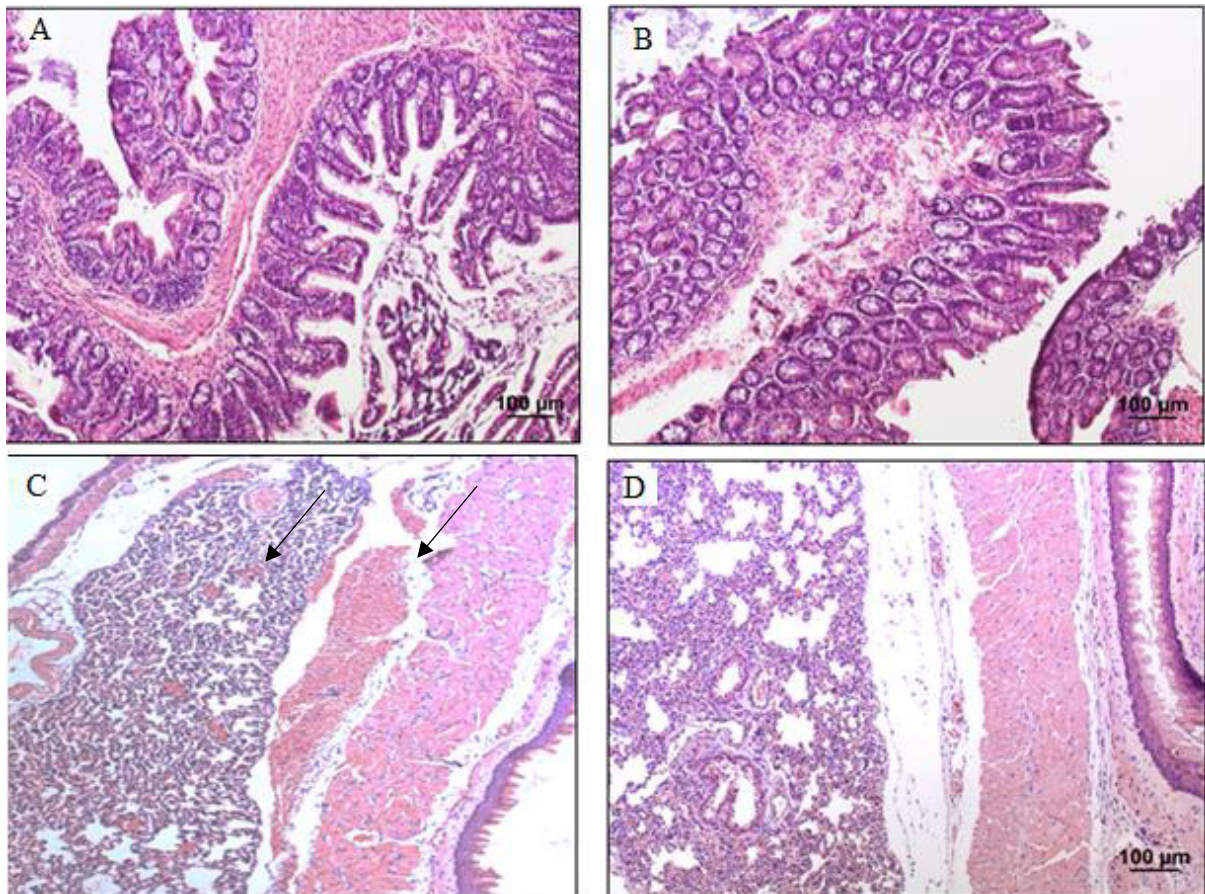


Figura 14 Efeito do tratamento profilático com própolis em animais com sepse induzida por CLP A – fotomicrografia do ceco do grupo CLP B- fotomicrografia do ceco do grupo tratado. C- fotomicrografia do pulmão do grupo CLP D- fotomicrografia do pulmão do grupo tratado. Os animais do grupo controle receberam PBS e o grupo tratado recebeu EPP100 6 horas antes da indução da sepse por CLP, os órgãos foram retirados, colocados em formol e enviados para o histopatológico, a análise das lâminas foram feitas de modo que o patologista desconhecesse os grupos.

5.8 A própolis modula a polarização de macrófagos in vitro

Para investigar se a própolis poderia estar afetando a ativação de macrófagos, células importantes no controle bacteriano, foi realizado um experimento in vitro com macrófagos polarizados. Foi observado que a própolis reduziu a produção de Óxido Nítrico em macrófagos peritoneais estimulados para o perfil M1 (Figura 15).

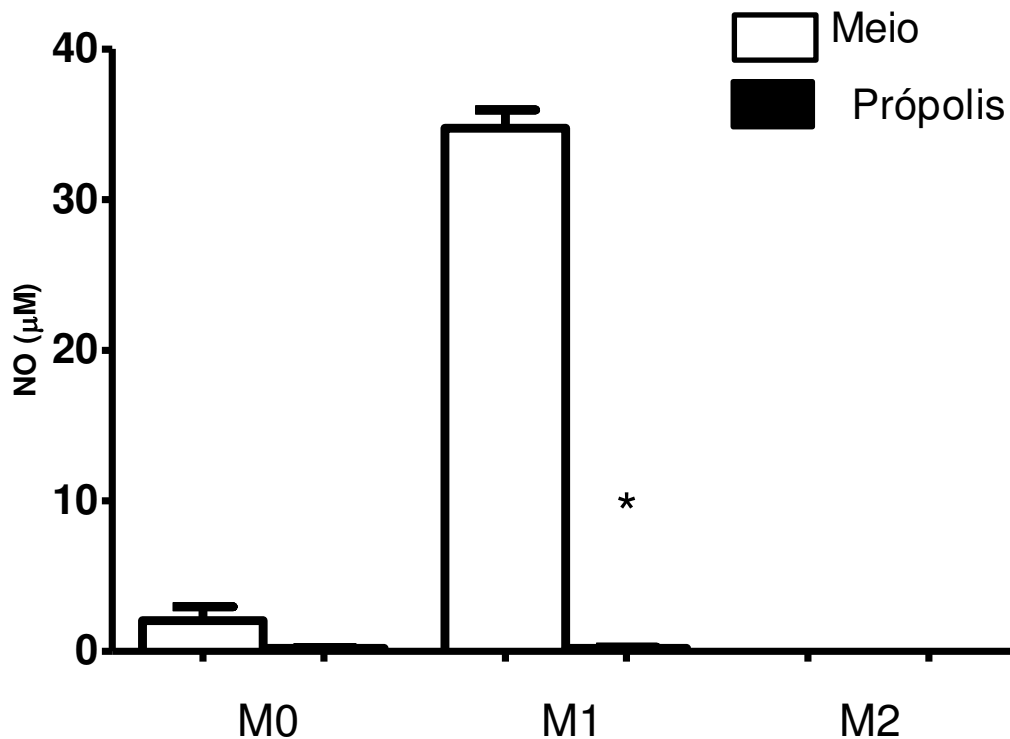


Figura 15 Produção de óxido nítrico em macrófagos polarizados tratados com própolis. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 foram polarizados para M1 (IFN- γ 10ng/mL+ LPS 200 ng/mL ou M2 (IL-10 40ng/mL+ IL-13 20ng/mL e tratados ou não com EPPAF (100 μ g/mL) durante 24 horas. A produção de NO foi avaliada usando o reagente de Griess. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não tratado com própolis.

Em relação as citocinas, foi observado que a própolis reduziu a produção de IL-10 (Figura 16A), MCP-1 (Figura 16B) e IL-6 (Figura 16C) em macrófagos M1 e M2. Quanto ao TNF, a própolis reduziu sua produção em macrófagos M0, M1 e M2 (Figura 16D). Por outro lado, a própolis aumentou a produção de IFN- γ em macrófagos M0 e em macrófagos M2, sem alterar de forma significativa a produção em M1 (Figura 16E). A própolis também aumentou a produção de IL-12 em macrófagos M0, M1 e M2 (Figura 16F).

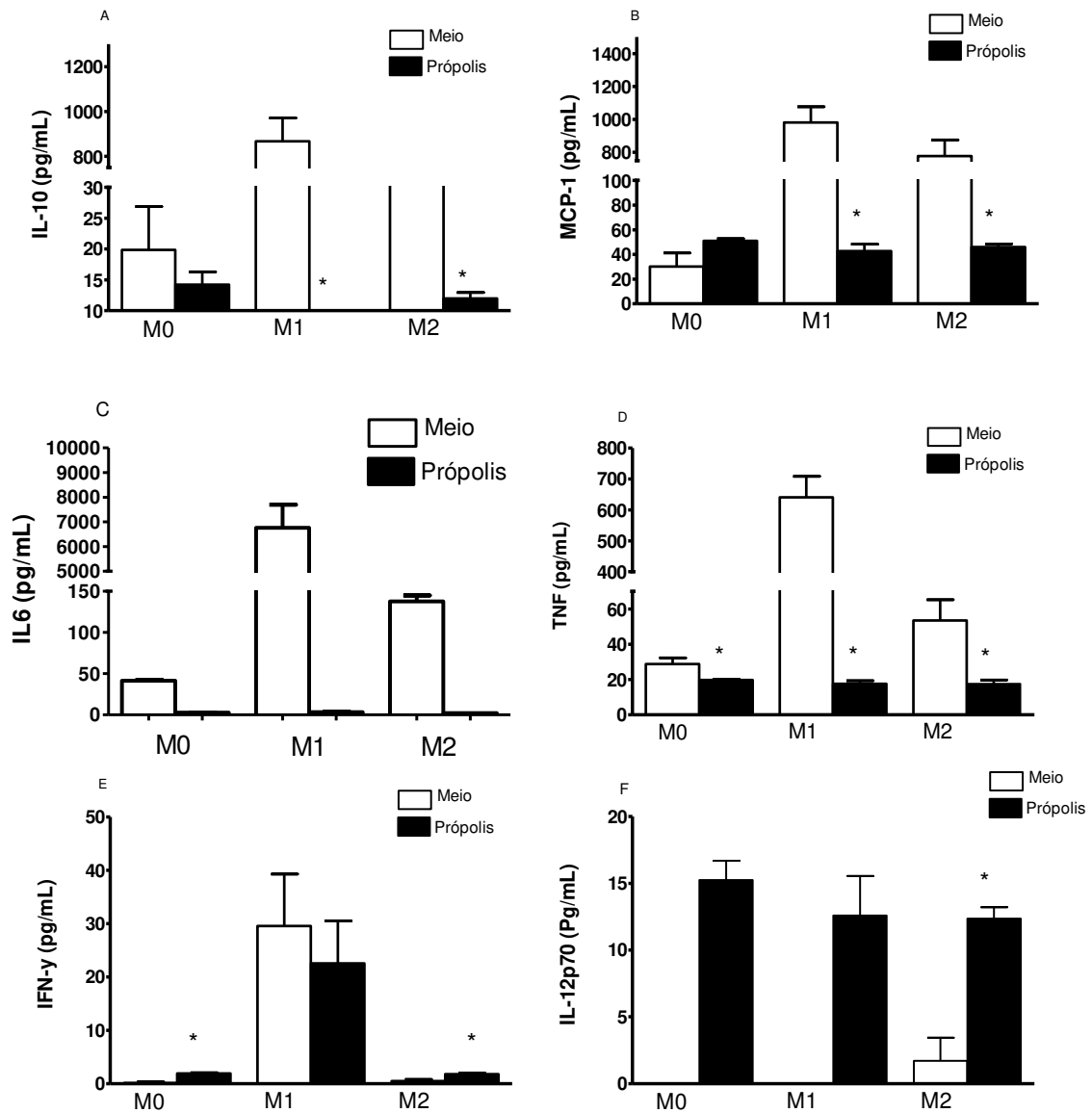


Figura 16. Produção de citocinas por macrófagos tratados com própolis. Macrófagos peritoneais de camundongos C57BI/6 foram polarizados para M1 (IFN- γ 10ng/mL+ LPS 200 ng/mL ou M2 (IL-10 40ng/mL+ IL-13 20ng/mL) e tratados ou não com EPPAF (100 μ g/mL) durante 24 horas. Após este tempo o sobrenadante foi coletado e as citocinas IL-10 (A), MCP-1 (B) IFN- γ (C), TNF- α (D), IL-12 (E) e IL-16 (F) foram dosadas por CBA. * $p < 0,05$ em comparação ao controle.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado que o tratamento profilático com extrato padronizado de própolis aumenta a expectativa de vida de camundongos com sepse, muito provavelmente por sua capacidade de reduzir a inflamação pulmonar e por modular a resposta inflamatória, reduzindo citocinas inflamatórias e aumentando citocinas estimuladoras, o que poderia reverter a imunossupressão causada pela sepse, diminuindo assim a progressão deletéria da doença.

O aumento na sobrevivência em animais tratados com própolis pode estar relacionado às propriedades anti-inflamatórias, antimicrobiana e imunomoduladora que o extrato de própolis exerce em quadros como a sepse (HUTCHINS et al., 2014). Efeito similar foi demonstrado por Fortes (2017) em camundongos imunossuprimidos e com sepse por *Candida albicans*, tratados de forma contínua com extrato de própolis. No referido trabalho foi demonstrado que a própolis induziu um aumento de 167% na expectativa de vida nestes animais e que este efeito foi decorrente de um aumento da capacidade fagocítica induzida pela própolis. Embora o agente infeccioso tenha sido diferente, sabe-se que o quadro fisiopatológico desencadeado pela sepse se assemelha mesmo com diferentes patógenos (TAKEUCHI et al., 2010).

A própolis e seus compostos são objeto de pesquisa a longo prazo tendo sua eficácia demonstrada também no mecanismo imunológico. Korish et al (2011), usando modelo de indução da sepse por LPS, demonstrou que o tratamento com derivados do extrato de própolis, como os flavonoides, induzia um quadro mais brando de sepse, além de um perfil inflamatório moderado com redução de citocinas pró inflamatórias e maior produção de citocinas reguladoras.

Além do efeito antiinflamatório já descrito, a própolis também tem efeito antimicrobiano contra diversos agentes tais como *Staphylococcus aureus* (PINTO et al., 2001); *Streptococcus pyogenes* (BORRELI et al., 2000); *Candida sp* (SFORCIN et al., 2000; STEPANOVIC et al., 2003) e sobre inúmeros outros microrganismos (BANKOVA et al., 2005). Foi verificado também que bactérias Gram positivas se mostram mais sensíveis que as Gram negativas aos extratos de própolis (PINTO et al., 2001).

A sepse induzida por CLP favorece a sepse polimicrobiana com gram-negativos e positivos da flora intestinal, dessa forma não houve diferença significativa na CFU do sangue, pulmão e peritônio, o que pode indicar um predomínio de bactérias intestinais gram-negativas, sendo essas menos sensíveis aos compostos antibacterianos da própolis como os flavonóides juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas que são considerados

os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis (PIETTA et al., 2002) e não afetado de maneira significativa nas Unidades formadoras de colônia.

Na sepse, a homeostase do organismo encontra-se ameaçada e o corpo reage a esse desafio de forma complexa, inicialmente prioriza o fornecimento de energia a órgãos vitais; segundo, aumentando a aptidão do organismo em combater o micróbio invasor e em terceiro estimulando o retorno à homeostase. Essa resposta foi descrita a primeira vez por Hans Selye em 1936 como Síndrome da Adaptação Geral. Diversos mediadores inflamatórios e neuroendócrinos influenciam nesse controle e esses fatores (BRANCO et al, 2007).

Dentre esses fatores inflamatórios a hiperglicemia está relacionada a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-6, que atuam por meio de alterações do metabolismo dos carboidratos aumentando a resistência periférica a insulina, elevação da glicogenólise hepática e aumento da gliconeogênese (BRANCO et al, 2007). A própolis induziu uma redução da glicemia nos animais com sepse, o que pode ser atribuído aos flavonoides e ácidos fenólicos o potencial hipoglicemiante da própolis (CHEEKE, 1987). O mecanismo de ação sugerido é que esses flavonoides se ligam a receptores de insulina, levando a ativação da tirosinaquinase que é fundamental para o efeito final da insulina, dessa forma, a hipoglicemia seria estimulada por uma potencialização desse mecanismo (OLIVEIRA et al, 2002). É importante ressaltar que estes resultados foram obtidos após tratamento na dose de 150mg/kg/dia de própolis durante 14 dias e os resultados com a própolis a partir do 5º dia, enquanto em nosso estudo, o tratamento foi profilático, em dose única de 100mg/kg.

Os animais tratados com própolis tiveram uma redução na glicemia quando comparados ao grupo controle, fato este que pode ter influenciado, ainda que indiretamente, no aumento da sobrevida dos animais. O papel da glicose na sobrevida e prognóstico dos pacientes sépticos é divergente entre os autores. Srinivasan et al (2004) estudaram 152 crianças e encontraram forte associação entre hiperglicemia e mortalidade, sugerindo que a hiperglicemia em crianças com sepse se demonstrou um fator de mal prognóstico. Por outro lado, estudos preliminares nos quais foi feito o controle da hiperglicemia demonstraram que houve redução das complicações renais, da polineuropatia em doença crítica, da infecção sanguínea e da necessidade da transfusão de hemoderivados e, em consequência, houve aumento na sobrevida dos pacientes (VAN DEN BERGHE et al, 2001).

Um outro fator que impacta na sobrevida, no prognóstico e é encontrado em pacientes com sepse é a trombocitopenia. Entre 15 – 58% dos pacientes internados em UTI com sepse, apresentam contagem plaquetária baixa, podendo variar quanto a características como idade e

sexo da população estudada. As causas da trombocitopenia na sepse se devem principalmente ao aumento de consumo, produção plaquetária deficiente e distribuição anormal ou diluição das plaquetas (UEHARA et al, 2010). Neste estudo não foi observada alteração nos parâmetros relacionados às vias de coagulação. Embora o aumento do RNI não seja significativo, pode demonstrar uma tendência da própolis em atuar como um anticoagulante, aumentando o TAP (via extrínseca da coagulação), porém é necessários estudos mais específicos sobre o efeito da própolis nos fatores de coagulação. É atribuído aos flavonoides a capacidade de impedir a agregação plaquetaria, porém também é descrito que, a depender da região o efeito pode ser o oposto, como demonstrado por Akbay et al (2017) usando extrato de própolis da Turquia.

Outra complicação que impacta diretamente na sobrevida é a insuficiência respiratória um dos quadros agravantes mais comuns na sepse, sendo a maior causa de internação, permanência e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva nesses pacientes, independente do sitio inicial da infecção. Esse mecanismo é explicado pela rica vascularização pulmonar e aos efeitos sistêmicos da inflamação. O elevado nível de citocinas circulantes, associado a distúrbios secundários causados pelo patógeno levam a um extravasamento de líquido do espaço intravascular para o extravascular gerando dano tecidual e edema, isso associado ao estresse oxidativo, má perfusão e patógeno circulante leva a atelectasias pulmonares com novos sítios de infecção, perda de função, hemorragias e necrose tecidual (VARISCO, 2011). Sabendo disto, foi avaliado o sitio primário da infecção (ceco) e o pulmão como órgão secundário, e avaliamos o efeito do extrato de própolis no histopatológico desses órgãos e avaliando os parâmetros de hemorragia, infiltrado, necrose e edema. Não foram observadas diferenças no ceco entre os animais que receberam tratamento com própolis e o grupo controle. Entretanto, foi observado, nos pulmões, uma redução da hemorragia e da necrose tecidual.

Os achados das análises histopatológicas no pulmão corroboram com a mudança de padrão encontrado na glicemia, uma vez que a hiperglicemia é um importante fator de complicação na regeneração tecidual (TAZIMA et al, 2008). Observou-se que os animais que não receberam tratamento com própolis tiveram um maior índice glicêmico, o que pode ter afetado a homeostasia e agravado o quadro. Esses achados ainda, são capazes de nos ajudar a compreender o aumento na sobrevida, com menor dano tecidual pulmonar tenho um aumento na expectativa de vida, visto que o a própolis foi capaz de atrasar a evolução natural da insuficiência respiratória no quadro de sepse.

A inflamação pode ser basicamente definida como uma mudança no equilíbrio morfo-imunológico em uma área específica do tecido causada por diferentes tipos de agentes, sejam

eles físicos, químicos ou biológicos. Pode ser representado por dilatação capilar e acúmulo de fluidos (edema) e pela migração e acumulação de fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) que também contribuem para hiperalgesia e perda de função do tecido (BALK et al, 2014).

You et al. (1998) descreveram o papel dos flavonoides na supressão da proliferação de linfócitos que acontece por meio da supressão da síntese de DNA de mononucleares do sangue periférico. Bratter et al. (1999) mostraram um decréscimo de células mononucleares no sangue periférico de animais induzidos a sepse por LPS e tratados com própolis, reafirmando o papel anti-inflamatório da própolis. Orsi et al. (2000), por sua vez, demonstraram em seus estudos com camundongos tratados com própolis por 3 dias, que macrófagos estimulados com IFN- γ produzem H₂O₂ e NO após o tratamento com própolis, demonstrando uma imunomodulação com maior reatividade dos macrófagos dos animais tratados com a própolis.

O mecanismo fisiopatológico da síndrome está relacionado à resposta inflamatória sistêmica em que o paciente apresenta uma reação inflamatória exacerbada associada a uma resposta antiinflamatória que leva à imunossupressão e aumenta a suscetibilidade a infecções secundárias (ANGUS e VAN DER POLL, 2013), dessa forma, a fim de compreender o mecanismo de ação da sepse e o papel exercido pelos macrófagos na infecção, fizemos o experimento *in vitro* com camundongos C57Bl/6 que são descritos na literatura com um perfil inflamatório mais exacerbado, dessa forma avaliamos a produção de algumas citocinas que desempenham importante papel no equilíbrio da resposta imunológica.

Embora não significativo, nosso resultado demonstrou uma tendência de aumento de neutrófilos no sítio da infecção quando comparado ao grupo controle, mecanismo semelhante ao descrito por Fortes (2017) no modelo de sepse fungica, os animais tratados com EPP100 tiveram a resposta modulada com recrutamento de fagócitos em sítio da infecção, maior atividade fagocítica, maior produção de NO e aumento na sobrevivência. Diante a isso, buscamos compreender o mecanismo de ação da própolis em macrófagos polarizados para M1 e M2 e tratados com própolis, avaliando a produção de óxido nítrico e citocinas importantes na inflamação e quadro séptico.

A própolis foi capaz de reduzir de forma significativa a produção de NO pelos macrófagos M1. O extrato de própolis pode atuar sobre a resposta imune inespecífica ativando macrófagos, induzindo a liberação de peróxido de hidrogênio e inibindo a produção de óxido nítrico de maneira dose-dependente (ORSI et al., 2000). Essa inibição pode ser explicada pelo fato de que a própolis inibe tanto a expressão da óxido nítrico sintase (iNOS) quanto a atividade

catalítica da iNOS (TAN-NO et al., 2006). Ao óxido nítrico é atribuída a ação antimicrobiana, o NO é produzido através da L-arginina por meio da iNOS e está correlacionado ao perfil de macrófagos inflamatórios (SOUSA et al, 2012) mas sua produção exacerbada está relacionada à lesão tecidual e a doenças inflamatórias crônicas (MIA et al, 2014). Dessa forma, a redução da produção de NO *in vitro*, pode nos direcionar a um possível mecanismo de “controle de danos”, visto que a exacerbção da resposta inflamatória contra o patógeno em quadros sépticos é a que leva a dano tecidual e falência orgânica (VAN DER POLL et al, 2017).

Em relação às citocinas, foi observado que a própolis inibiu a produção exacerbada de citocinas inflamatórias pelos macrófagos M1, o que ocasionou também uma redução da citocina reguladora IL-10. A IL-10 tem um papel modulador da resposta pró inflamatória, ela é capaz de movimentar o sistema imunológico de uma resposta mediada por células para uma resposta humoral, tem também, a capacidade de bloquear algumas enzimas pró-inflamatórias (BURKOVSKIY, 2013). Na sepse, o papel da IL-10 é controverso em animais programados geneticamente para não produção de IL-10, observou-se que só há aumento na sobrevida se a IL-10 for oferecida como tratamento após o desafio com a sepse, anterior a isso, a sobrevida reduz (BURKOVSKIY, 2013).

Os macrófagos quando polarizados para o perfil M2, de perfil regulador quando tratado com a própolis tiveram a produção de IL-10 suprimida, mostrando um perfil imunomodulador e indicando uma polarização para macrófagos, M1, mais inflamatório. TATEFUJI et al., (1996) trataram macrófagos com compostos da própolis e observaram uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e atribui a isso a sua maior capacidade microbicida. Entretanto, em nosso trabalho, a própolis não chegou a proporcionar uma polarização para o perfil M1, pelo contrário.

Fato que merece destaque é o efeito da própolis na produção do IFN- γ e na IL-12. Ambas as citocinas são cruciais para indução de ativação de células efetoras. Este fato torna-se ainda mais relevante quando se leva em consideração que o estímulo foi dado inclusive aos macrófagos residentes e macrófagos M2, sugerindo que a própolis poderia ativar estas células para um perfil ativador sem, necessariamente, ser inflamatório.

O IFN- γ já demonstrou em outros estudos, um importante papel no combate a imunossupressão causada pela sepse exercendo um papel de imunoestimulador aumentando a capacidade e atividade dos fagócitos (SCUMPIA et al, 2005). Além disso, foi observado por Rauch (2012) que a resposta efetiva de Linfócitos B, com a devida produção de IFN- γ contribui para o *clearance* bacteriano e aumento na sobrevida dos camundongos quando comparado com animais com linfócitos B deficientes.

A IL-12, por sua vez, tem como importante fonte, macrófagos estimulados, neutrófilos e células B, a sua função é importante na polarização de resposta para TH1 com elevada produção de citocinas inflamatórias. Heufler (1996) demonstrou sua produção por meio de células dendríticas e a elevação de IFN- γ sem a necessidade de outras citocinas co-estimuladoras.

Korish et al (2011) demonstrou em seu experimento de sepse induzida por LPS que a IL-1, IL-6 e TNF se elevavam de forma exagerada no grupo controle levando ao colapso circulatório, endotoxemia e hipoperfusão tecidual. Os animais quando tratado com própolis tiveram redução, dessas mesmas citocinas IL-1, IL-6 e TNF e esses animais tiveram maior expectativa de vida. Dessa forma, nosso experimento demonstra essa tendência moduladora da própolis, a produção de IL-6 foi menor nos macrófagos polarizados M2 (IFN- γ + LPS) e M1(IFN- γ + LPS) assim como o TNF que diminuiu em todos os grupos tratados.

Como vimos, o diagnóstico precoce é de extrema importância para um melhor prognóstico dos pacientes com sepse. Sendo a sepse definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a infecção (SINGER et al, 2016), porém a terapia utilizada é direcionada ao combate do agente infeccioso. Nosso trabalho trás como perspectiva a profilaxia com ferramenta imunomoduladora. Em um contexto em que o diagnóstico é realizado na maioria das vezes em Unidades de Terapia Intensiva, um produto natural como adjuvante terapêutico/profilático poderia mudar a história natural da doença, impactando na sobrevida e no tempo de internação.

7. CONCLUSÕES

- O Extrato Padronizado de Própolis Apis Flora foi capaz de aumentar a expectativa de vida em camundongos com sepse induzida por CLP quando comparado ao grupo controle.
- O tratamento com EPPAF não foi capaz de reduzir as Unidades Formadoras de Colônias no pulmão, sangue e peritônio dos animais com sepse induzida por CLP.

- O EPPAF reduziu a glicemia dos animais tratados quando comparado com o grupo controle, essa mudança de padrão pode ter contribuído para o aumento da expectativa de vida dos animais, visto que a hiperglicemia em pacientes sépticos indica um mal prognóstico.
- O EPPAF indicou uma mudança dos padrões de coagulação, principalmente se avaliado a via extrínseca por meio do TAP. Quanto ao número total de plaquetas a própolis não exerceu influência.
- O EPPAF não impactou de forma significativa na contagem de células da medula e do sangue periférico, na contagem de diferencial do peritônio o grupo tratado demonstra uma tendência de aumento de neutrófilos, indicando um efeito modulador da própolis.
- Animais tratados com EPPAF tiveram redução da hemorragia e da necrose tecidual do tecido pulmonar no histopatológico. Uma maior preservação do parênquima pulmonar influencia diretamente na sobrevivência, visto que a falência respiratória é uma das principais complicações da sepse.
- O EPPAF é capaz de modular o perfil de polarização de macrófagos peritoneais de camundongos (*in vitro*) reduzindo a produção de IL-10 que pode indicar uma potencialização do mecanismo efetor dos macrófagos revertendo o quadro de imunossupressão que a sepse ocasiona, nesse mesmo sentido a própolis foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ e IL-12 que desempenham importante papel na reversão do quadro de imunossupressão.
- O tratamento com EPPAF foi capaz de reduzir a produção de TNF, IL-1 e IL-6 por macrófagos peritoneais *in vitro*, indicando um efeito anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- AJROUCHE, R et al. Statins decrease mortality in Lebanese patients with sepsis: A multicenter study. **Pharmacy Practice**, 11(2):102-106, 2013.
- AKBAY, E et al. Effects of propolis on warfarin efficacy. **Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, 14(1):43-46, 2017
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, 369(9):840-851, 2013.

- ARAÚJO, M.A.R et al. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 22(1):208-219, 2012.
- BACHIEGA, T.F. et al. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Products Research**, 27(18):1646-50, 2013.
- BAKER, C.C. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine caecal ligation and puncture model. **Surgery**, 94(2):331-335, 1983.
- BALK, R.A. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101(6):1644-55, 2014.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, 100 (1–2):114–7, 2005.
- BARLAK, Y. et al. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. **Proteome Science**, 9:74, 2011.
- BERRETTA, A. A. et al. Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 641480, 2013
- BARUD, H.S. et al. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : ECAM**, 703024, 2013.
- BENJAMIN, C.F. et al. Inhibition of Leukocyte Rolling by Nitric Oxide during Sepsis Leads to Reduced Migration of Active Microbicidal Neutrophils. **Infection and Immunity**, 3602–3610, 2002.
- BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, 73:S53–S63. 2002.
- BRANCO, R.G, et al. Controle glicêmico e terapia insulínica em sepse e doença crítica. **Jornal de Pediatria**, 83(5):S128-S136, 2007.
- BRÄTTER C. et al. Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: a clinical pilot study **Forsch Komplementarmed** 6(5):256-60, 1999.
- BURAS, J. A. et al. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, 4(10):854-865, 2005.
- BURKOVSKIY I. et al. Cytokine release in sepsis. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, 4 (9): 860-865, 2013.
- CAPOCI, I. R. G. et al. Propolis Is an Efficient Fungicide and Inhibitor of Biofilm Production by Vaginal *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015:1–9, 2015.
- CHEEKE, P.R. **Alimentación y nutrición del conejo**. Academic Press 1987
- CONTI, B. J. et al. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 67(10):1431–1438, 2015.

- COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**,12(4):564-582, 1999
- DING, A.H. et al. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages . Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, 7(141):2407–2412, 1988.
- FARIAS, J. H. C. et al. Effects of Stingless Bee Propolis on Experimental Asthma. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 8, 2014.
- FARNESI, A. P. et al Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, 8(2):635–640, 2009.
- FATAHINIA, M. et al. Propolis efficacy on TNF-a , IFN-g and IL 2 cytokines production in old mice with and without systemic candidiasis. **Journal de Mycologie Médicale**, 237–242, 2012.
- FLEISCHMANN, C et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 193(3):259-72, 2016
- FORTES B. T. **Extrato padronizado de própolis (epp-af®) aumenta a sobrevida em camundongos imunossuprimidos com sepse induzida por *Candida albicans***. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Maranhão, São Luís.
- FUNARI, C.; FERRO, V.. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1:171-178,. 2006.
- GARDANA, C. et al. Biotransformation Strategy To Reduce Allergens in Propolis. **Applied and Environmental Microbiology**, 78, (13): 4654–4658, 2012.
- GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive Care Medicine**, 32 (12):2077-2077, 2006.
- GUPTA, M. et al. Antitumor activity of methanolic extract of Cassia fistula L . seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**, 72:151–156, 2000.
- HEUFLER, C. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. **European Journal of Immunology**.,26(3):659-68, 1996.
- HORI, J. I. et al. The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 2007, 2013.
- HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E., The pathophysiology and treatment of sepsis. **New England Journal of Medicine**, 348:138–50, 2003.
- HU, F. et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, 100 (3):276–283, 2005.
- HUTCHINS, N.A et al. The new normal: immuno-modulatory agents against sepsis immune suppression. **Trends in molecular medicine**. 20(4):224-233, 2014.
- KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. Staphylococcus aureus Protein A Promotes Immune Suppression. **mBio**.;4(5):e00764-13. 2013.

- KOCH, F. et al, High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. **The Journal of Experimental Medicine**, 184(4): 741-746,1996.
- KORISH, A.A et al. Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 15n (4):332-338, 2011.
- KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, 64 (3):235–240, 1999.
- KUMAZAWA, S. et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, 84(3):329–339, 2004.
- KUROPATNICKI, A. K. et al. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 964149. 2013.
- KWAK, B et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nature America**. 6(12) 1399-402 2000.
- LEITÃO, D. P. D. S. et al. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, 27(11):1834–1839, 2004.
- LIBERIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 11(1):108, 2011.
- MACHADO, J. L. et al. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine v.** 2012, Article ID:157652, 2012.
- MACIEL M.C.G. et al. *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 8:57, 2008.
- MARTIN G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 10(6):p.701-6, 2012.
- MAYR, F. B. et al. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, 5(1):4-11, 2014.
- MIA S. et al. An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. **Scandinavian Journal of Immunology**, 79:305–314,2014.
- MILLER, L.S.; CHO, J.S.. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. **Nature reviews Immunology**,11(8):505-518. 2011.
- MILLER, T.A et al. Changes in mouse circulating leukocyte numbers in C57BL/6 mice immunosuppressed with dexamethasone for *Cryptosporidium parvum* oocyst production. **Veterinary Parasitology**, 149 (3–4):147–157, 2007.
- MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 55 (6):441–449, 1996.

- MISSIMA, F et al. Green Brazilian Propolis Action on Macrophages and Lymphoid Organs of Chronically Stressed Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**. 2008;5(1):71-75.
- NASCIMENTO, F. R. F. et al. Interferon regulatory factor (IRF)-1 is a master regulator of the cross talk between macrophages and L929 fibrosarcoma cells for nitric oxide dependent tumoricidal activity. **PLoS ONE**, 10(2):1–19, 2015.
- OLIVEIRA, T.T. et al. Efeito de antocianina e própolis em diabetes induzida em coelhos. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, Ribeirão Preto, 35(4): 464-469, 2002.
- ORSATTI, C. L. et al. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 129 (3):314–8, 2010.
- ORSI, R. O et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venoms and Animals Toxins including Tropical Diseases**, 6(2):205-219, 2000.
- PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Currents in Microbiology**,36(1):24–28, 1998.
- PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, 587 (1–3): 296–301, 2008.
- PENG, Z.Y. et al. Bactericidal antibiotics temporarily increase inflammation and worsen acute kidney injury in experimental sepsis. **Critical Care and Medicine**, 40 (2):538, 2012.
- PIETTA, P.G. et al. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, 73, S7-S20. 2002.
- PINTÃO, M.C.T. et al. Coagulação intravascular disseminada. **Simposio: Hemostasia e Trombose**. p. 282-291. 2001
- PINTO, M.S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 38: 278-283, 2001.
- RAUCH, P. J. et al. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. **Science** 335: 597–601, 2012.
- RHODES, A. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. **Intensive Care and Medicine**, 43(3):304- 377, 2017.
- RIOS, C.H.P. et al. *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Frontiers in Microbiology**, 8(148):1-7, 2017.
- SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2(1):33–38, 2005.
- SCUMPIA, P. O. et al. CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. **Journal of Immunology**, 175, 3282–3286, 2005.
- SEGAL, A.W. et al. How Neutrophils Kill Microbes. **Annual Review of Immunology**, 23:197–223, 2005.

- SERAFIM, R. et al A Comparison of the Quick-SOFA and Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria for the Diagnosis of Sepsis and Prediction of Mortality **CHEST**, 153(3): 646 – 655 2017
- SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, 7(1):139–144, 2001.
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, 133(2):253–260, 2011.
- SHAPIRO, H. et al. Polyphenols in the prevention and treatment of sepsis syndromes: rationale and pre-clinical evidence. **Nutrition**, 25 (10):981-997, 2009.
- SILVA, F.P. et al . HLA-A*31 como marcador de suscetibilidade genetica em sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 25(4):284-289, 2013 .
- SINGER, M. et al. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, 315(8):801-810, 2016.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F.J. **Biometry: The principle and practice of statistics**. Biological Research. 2 ed. New York: W. H. Freeman and company, 1996.
- SOUZA JUNIOR, T.P. et al . Óxido nítrico e exercício: uma revisão. **Revista de Educação Física da UEM**, 23 (3):469-481, 2012.
- SRINIVASAN, V. et al. Association of timing, duration, and intensity of hyperglycemia with intensive care unit mortality in critically ill children. **Pediatric Critical Care and Medicine**, 5:329-36, 2004.
- STEPANOVIC, S. et al. In vitro antimicrobial activity of rópolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. **Microbiology Research** 158 (4):353- 357, 2003.
- TAKEUCHI, O. et al. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, 140(6): 805 – 820. 2010.
- TAN-NO, K. T. A. N. et al. Anti-inflammatory Effect of Propolis through Inhibition of Nitric Oxide Production on Carrageenin-Induced Mouse Paw Edema. **Creative commons Attribution**, 29(1):96–99, 2006.
- TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biology Pharmaceutical Bulletin**.19(7):966-70, 1996.
- TAZIMA, M.F.G.S. et al. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)** , 41:259-64, 2008.
- UEHARA, K.M. et al. Thrombocytopenia as a prognostic factor in patients with severe sepsis in Intensive Care Unit. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.2010, 195-200, 2010.
- VAN DEN BERGHE, G. et al. Intensive insulin therapy in the medical ICU. **New England Journal of Medicine**, 354:449-61, 2006.
- VAN DER POLL T. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Review Immunology**, .17(7):407-420, 2017.

VAN DER POLL, T. et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **The Journal of Immunology**, 155(11):5397-5401, 1995.

VARISCO, B.M. The Pharmacology of Acute Lung Injury in Sepsis. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2011: 254619, 2011.

VINCENT, J. Emerging therapies for the treatment of sepsis. **Current Opinion in Anesthesiology**, 28 (4):411-416, 2015.

WICHTERMAN, K. A. et al. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, 29(2):189-201, 1980.


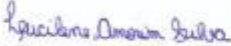
WIERSINGA, W.J. et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**. 5(1):36-44, 2014

XUAN, H. et al. Inhibitory Effect of Chinese Propolis on Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Activity in Vascular Endothelial Cells. v. 2011, Article ID 985278 2011.

YAMASHIRO S. et al. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. **Journal of Leukocyte Biology**, 69(5):698-704, 2001.

ANEXOS

ANEXO I

 <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA CIAEP:01.0341.2014</p>	
<p>CERTIFICADO</p>	
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito da polarização de macrófagos por agentes infecciosos, tumores e imunomoduladores naturais sobre a susceptibilidade de hospedeiros em diferentes modelos experimentais" registrada com o nº 23115.003819/2016-11, sob a responsabilidade de Flávia Raquel Fernandes do Nascimento que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado Aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 07/06/2016.</p>	
FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	4 ANOS
Espécie/inhagem/raça	Mus musculus (camundongo) / Balb/c C57Bl/6 e Swiss
Nº de animais	600
Peso/idade	20-30g / 3-4 meses
Sexo	Machos / fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA
 Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA UFMA	