

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO

**EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS (EPP-AF®)
AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS
IMUNOSSUPRIMIDOS COM SEPSE INDUZIDA POR *Candida
albicans***

THIARE SILVA FORTES BRAGA

São Luís

2017

THIARE SILVA FORTES BRAGA

**EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS (EPP-AF[®])
AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS
IMUNOSSUPRIMIDOS COM SEPSE INDUZIDA POR *Candida
albicans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Flavia Raquel Fernandes do Nascimento

Co-orientadora: Dra. Andresa Aparecida Berreta e Silva

São Luís

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva Fortes Braga, THIARE.
EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS EPP-AF® AUMENTA A
SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS IMUNOSSUPRIMIDOS COM SEPSE
INDUZIDA POR *Candida albicans* / THIARE Silva Fortes Braga.
- 2017.

101 p.

Coorientador(a): Andresa Aparecida Berreta e Silva.
Orientador(a): FLAVIA RAQUEL FERNANDES DO NASCIMENTO.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2017.

1. *Candida albicans*. 2. Dexametasona. 3.
Imunomodulação. 4. Própolis. 5. Sepsis. I. Berreta e
Silva, Andresa Aparecida. II. FERNANDES DO NASCIMENTO,
FLAVIA RAQUEL. III. Título.

THIARE SILVA FORTES BRAGA

**EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS (EPP-AF[®])
AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA EM CAMUNDONGOS
IMUNOSSUPRIMIDOS COM SEPSE INDUZIDA POR *Candida
albicans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador (Prof^ª. Dra Elizabeth Soares Fernandes)
Universidade CEUMA

2º Examinador (Prof. Dr. Eduardo M. de Sousa)
Universidade CEUMA

3º Examinador (Prof^ª. Dra. Conceição de Maria Pedroso S de Azevedo)
Universidade Federal do Maranhão

4º Examinador (Prof. Dr. Paulo Vitor Pereira Soeiro)
Universidade Federal do Maranhão

“Sonhe com as estrelas, apenas sonhe, elas só podem brilhar no céu. Não tente deter o vento, ele precisa correr por toda parte, ele tem pressa de chegar, sabe-se lá aonde. As lágrimas? Não as seque, elas precisam correr na minha, na sua, em todas as faces. O sorriso! Esse, você deve segurar, não o deixe ir embora, agarre-o! Persiga um sonho, mas, não o deixe viver sozinho. Alimente a sua alma com amor, cure as suas feridas com carinho. Descubra-se todos os dias, deixe-se levar pelas vontades, mas, não enlouqueça por elas. Abasteça seu coração de fé, não a perca nunca. Alargue seu coração de esperanças, mas, não deixe que ele se afogue nelas. Se achar que precisa voltar, volte! Se perceber que precisa seguir, siga! Se estiver tudo errado, comece novamente. Se estiver tudo certo, continue.”

Fernando Pessoa

À minha orientadora Flávia Nascimento,
por compartilhar seus conhecimentos,
proporcionar experiências incríveis e
incentivar diariamente meu crescimento
profissional.

Gratidão eterna!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha força, meu escudo e alimento diário da alma, e mesmo não sendo merecedora, presenteou-me e presenteia colocando pessoas tão especiais em minha vida.

Ao Prof. Henrique Serezani, pela oportunidade, atenção e paciência durante minha estadia nos EUA. Minha experiência com você, e toda sua equipe foi de fundamental importância para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Prof^a. Rosane Guerra, pela preocupação, incentivo e carinho.

À Annie Piñeros, minha irmã colombiana, por ter me recebido da maneira mais agradável e amável nos EUA. Por ter sido e continuar sendo zelosa e amiga.

Aos queridos colegas de trabalho, Marcio Camelo, Clever Fernandes, Leonardo Dall'Agnoil e Elídio Guarconi, pela compreensão nos meus momentos de estresse e agonia. Obrigada pelo incentivo e carinho.

As minhas irmãs-amigas de infância, Ariádny Limeira e Suely Castro, por compreenderem todos os meus momentos de ausência, por me incentivarem no meu crescimento profissional, muitas das vezes, até sendo dura quando a vontade era de desistir e, claro pelas boas e deliciosas risadas. Em especial, a você, Ary, por estar tão longe mas ao mesmo tempo, tão perto, e por me fazer viver e sentir a vida tão intensamente. Amo vocês!

A minha família maravilhosa que me aturou durante o meu crescimento profissional, que na grande maioria das vezes foram áduos, mas que souberam lidar com esse período, não há dúvidas do amor de vocês...são realmente guerreiros! A flor mais linda de todos os jardins, minha mãe Gorette, minha melhor amiga, confidente e a maior incentivadora para a minha formação como pesquisadora. Ao meu príncipe João Fortes, por estar sempre preocupado com minha saúde mental, física e por querer estar por perto. Aos meus irmãos Gabriel e Samuel, obrigada por me fazerem sentir um amor incondicional, o de ser tia babona. Por me proporcionarem momentos incríveis ao lado de Sofia e Alice, aliviando a tensão. E as minhas cunhadas malas, porém amigas, Flavinha e Manu, por saberem lidar com meu ciúme, proteção e, mesmo assim, depositarem confiança, amor e carinho na cunhada maravilhosa e humilde que sou.

Ao meu esposo Flávio Braga, por ser esse grande e admirável homem. Por me mostrar que a vida é de baixos e correr atrás dando o melhor de si, é a melhor forma para conquistar os nossos objetivos. Pelo amor, carinho, incentivos incansáveis para finalizar este trabalho, e fazendo ter repúdio pela palavra FOCO.

A minha eterna gratidão aos lifianos que me alegram, às vezes, estressam, mas na maioria acalmam. A nossa linda D. Joana, com sua doçura, zelo e preocupação. Meu agradecimento especial a Douglas (Dodó), por estar sempre disponível e nos fazer sorrir com seu jeito sincero de ser; ao André Vale (Dé), pela disponibilidade em todos os sentidos, principalmente, por ser essa energia tão boa e calma, e como não poderia esquecer, a minha linda, doce e eterna aluna de IC, Lilian (Lili), pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela confiança gerada na sua formação e por te ver crescer diariamente. Meus dias nessa fase final não seriam tão leves se não fosse pelo acolhimento de vocês.

À DIRETORIA do LIF: Wanderson, Aramys, Márcia, Paulo Vitor, Lucilene, Bruno, Ana Paula, Mayara e Joleen, por fazerem deste grupo movimentadíssimo, com conversas boas, polêmicas que nos faz manter essa amizade diferenciada fora do laboratório.

O meu eterno carinho, amizade por três mulheres que fazem o diferencial em minha vida: Lucilene, vulga Bilga, por ser tão doidinha, acolhedora, engraçada e me fazer sentir especial no laboratório e em sua vida; A Mayara (Neguinha), minha irmã caçula, pela ajuda, pela sua calma, amor, incentivo, pelos puxões de orelha da forma doce, e por essa doçura me fazer descabelar pela maneira com que as pessoas abusam dela. E a minha admirável irmã científica mais experiente, Ana Paula Azevedo, por me dá colo, aconchego, ser muitas vezes minha psicóloga, e tornar meus dias mais leves com noites de comilança e boas conversas.

A Ana Lucia Cordeiro, uma amiga e que me deu colo e puxou minha orelha durante toda a Pós-Graduação.

Quando se acredita em destino e que Deus providencia tudo na hora e no momento certo, me faz agradecer imensamente a Andresa Berretta, que me proporcionou trabalhar com fungo e própolis e reacender a paixão pela Microbiologia, já despertada na graduação. Por ter permitido o convívio com sua família, ampliando os laços de amizade e carinho. Muito obrigada por todos esses anos de trabalho e, finalmente, o artigo vai sair!!

Início o mais importante agradecimento deste trabalho citando Isaac Newton: “Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”. Quando penso na palavra gigante, é impossível não lembrar desta citação e ao mesmo tempo de ti, Flávia Nascimento. Não somente pelas orientações ao longo desses 12 anos, mas por afastar de mim, o medo de coisas que não compreendia, levando pôr fim a compreendê-las; por depositar confiança e convencer que sou melhor do que suspeitava, fazendo me capaz de alcançar meus sonhos; por ser exemplo de profissionalismo pela forma, que estimula e enriquece a vida dos seus alunos e por não medir esforços para nosso crescimento. Minha eterna gratidão por ti! Te amo!

As agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMA pelos auxílios fornecidos.

À Universidade Federal do Maranhão, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de realizar este doutorado.

Muito obrigada!

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. Dentre as atividades antimicrobianas da própolis já comprovadas, destaca-se: a ação antifúngica observada em cepas de *Candida albicans*, fungo comensal do trato oro-gastrointestinal e da pele, associado a infecções oportunistas, locais ou sistêmicas, em especial, em pacientes imunossuprimidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF[®]) na infecção sistêmica ocasionada por *C. albicans* em camundongos imunossuprimidos. Inicialmente, os camundongos C57Bl/6 foram imunossuprimidos com dexametasona (3mg/kg) durante uma semana e, no oitavo dia foram infectados, por via intraperitoneal, com blastóporos de *C. albicans* (2×10^6). Após 24 horas da infecção, foi iniciado o tratamento diário dos animais com própolis nas doses de 10 e 100mg/Kg, durante 15 dias, por via intraperitoneal. A imunossupressão com dexametasona foi mantida ao longo de toda a análise. Ao final dos 15 dias, observou-se que todos os animais tratados com própolis na dose de 100mg/Kg, mantinham-se vivos, enquanto todos os animais dos demais grupos já haviam morrido. A partir daí, passou-se a investigar possíveis mecanismos imunológicos que explicassem esse efeito. Para isto, foi repetido o mesmo protocolo de imunossupressão e infecção descritos acima, entretanto, o tratamento foi realizado em uma única aplicação de própolis na dose de 100mg/Kg, 24 horas após a infecção e os ensaios foram realizados 24 horas após esse tratamento. O tratamento com própolis reduziu as unidades formadoras de colônia no peritônio e no baço. Além disso, a própolis reverteu a imunossupressão induzida pela dexametasona, aumentando o número de leucócitos circulantes, principalmente, neutrófilos, a proliferação de esplenócitos, o recrutamento de leucócitos ao sítio da infecção e aumento de linfócitos T CD4+. Em relação aos mediadores inflamatórios, foi observado que o tratamento com própolis induziu o aumento da produção *ex vivo* de óxido nítrico por células peritoneais e a diminuição das citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) plasmáticas. Finalmente, em experimento *in vitro*, macrófagos peritoneais foram tratados com dexametasona (4 μ g/mL), por 48 horas, e, em seguida, tratados com própolis (100 μ g/mL), durante 12 horas. Ao final, as células foram incubadas com *C. albicans* por 1 hora. Neste ensaio, foi observado que a própolis aumentou a fagocitose, sem, no entanto, alterar a expressão proteica de Dectina-1 e Receptor de manose. Em conclusão, o extrato padronizado de própolis aumentou a expectativa de vida e reduziu a disseminação de *C. albicans* em camundongos imunossuprimidos. Tais efeitos, provavelmente devem-se a sua capacidade de reverter a imunossupressão induzida pela dexametasona, recrutando e ativando células imunes inatas para o sítio da infecção, além de reduzir as citocinas inflamatórias séricas, diminuindo, assim, a progressão dos aspectos deletérios da candidemia sistêmica.

Palavras-chave: Própolis. Dexametasona. *Candida albicans*. Imunomodulação. Sepse.

ABSTRACT

Propolis produced by bees *Apis mellifera* is a resinous balsamic material used to protect the hive against fungi, bacteria, viruses and insects. Among the antimicrobial activities of propolis already proven, the antifungal action observed in strains of *Candida albicans*, commensal fungus of the oro-gastrointestinal tract and skin, associated with opportunistic infections, local or systemic, especially in immunosuppressed patients, are highlighted. The objective of this study was to evaluate the effect of treatment with standardized extract of propolis on systemic infection caused by *C. albicans* in immunosuppressed mice. Initially the C57Bl/6 mice were immunosuppressed with dexamethasone (3mg / kg) for one week and, on the eighth day, were infected intraperitoneally with *C. albicans* blastospores (2×10^6). After 24 hours of infection, the daily treatment of the animals with propolis at the doses of 10 and 100 mg/kg was initiated for 15 days intraperitoneally. Immunosuppression with dexamethasone was maintained for all the analysis. At the end of the 15 days, all the animals treated with propolis at the dose of 100 mg/kg were kept alive, while all the animals from the other groups had already died. From then on, it was possible to investigate possible immunological mechanisms to explain this effect. For this, the same protocol of immunosuppression and infection described above was repeated, however, the treatment was performed in a single application of propolis at a dose of 100 mg/kg, 24 hours after infection and the tests were performed 24 hours after this treatment. Treatment with propolis reduced the colony forming units in the peritoneum and spleen. In addition, propolis reversed dexamethasone-induced immunosuppression, increasing the number of circulating leukocytes, mainly neutrophils, proliferation of splenocytes, recruitment of leukocytes to the site of infection and increase of CD4⁺ T lymphocytes. Regarding the inflammatory mediators, it was observed that the treatment with propolis induced the increase of the *ex vivo* production of nitric oxide by peritoneal cells and the reduction of plasmatic inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α). Finally, in an *in vitro* experiment, peritoneal macrophages were treated with dexamethasone (4 μ g/mL), for 48 hours, and then treated with propolis (100 μ g/mL) for 12 hours. Then, cells were incubated with *C. albicans* for 1 hour. In this assay, it was observed that propolis increased phagocytosis, without, however, altering Dectin-1 and Mannose receptor expression. In conclusion, the standardized extract of propolis increased life expectancy and reduced *C. albicans* dissemination in immunosuppressed mice. Such effects are probably due to its ability to reverse dexamethasone-induced immunosuppression, recruit and activate effector immune cells to the site of infection, and reduce serum inflammatory cytokines, thereby reducing the progression of the deleterious aspects of systemic candidemia.

Keywords: Propolis. Dexamethasone. *Candida albicans*. Immunomodulation. Sepsis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–Fases morfológicas do ciclo de <i>Candida albicans</i>	17
Figura 2	–Função gênica na formação de biofilme.....	18
Figura 3	–Estrutura da parede celular de <i>C. albicans</i>	20
Figura 4	–Reconhecimento de <i>Candida albicans</i> por células da imunidade inata.....	21
Figura 5	–Invasão do epitélio por <i>Candida albicans</i>	23
Figura 6	–Imunopatogênese de vulvovaginite por <i>C.albicans</i>	26
Figura 7	–Resposta do hospedeiro para infecção oral por <i>Candida albicans</i>	27
Figura 8	–Mecanismos de ação de drogas antifúngicas.....	29
Figura 9	– Extrato de própolis aumenta a sobrevivência de camundongos imunossuprimidos com dexametasona e infectados com <i>Candida albicans</i>	43
Figura 10	–O tratamento com extrato de própolis diminuiu o número de unidades formadoras de colônias no peritônio e no baço de animais imunossuprimidos infectados com <i>C. albicans</i>	47
Figura 11	–Efeito do extrato de própolis em linfócitos T auxiliares de animais imunossuprimidos e infectados com <i>C. albicans</i>	49
Figura 12	–Extrato de própolis aumenta a produção de óxido nítrico na cultura de células peritoneais de animais imunossuprimidos e infectados com <i>C. albicans</i>	50
Figura 13	–Aumento da fagocitose em macrófagos incubados com extrato de própolis e infectados com <i>C.albicans</i>	51
Figura 14	–Extrato de própolis não induz a expressão protéica de Dectina-1 e Receptor de Manose em macrófagos	52

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	–Sobrevida de animais infectados com <i>Candida albicans</i> e tratados, após a infecção, com extrato de própolis (P10 e P100) durante quinze dias.....	44
		Immunobiology	
Tabela	2	–Efeito do tratamento intraperitoneal com extrato de própolis nos parâmetros hematológicos de camundongos C57Bl/6, infectados com <i>C.albicans</i>	45
Tabela	3	–Contagem diferencial sanguínea de camundongos imunossuprimidos (controle) e animais com <i>Candida</i> (infectados) tratados pela via intraperitoneal P 100.....	46
Tabela	4	–Efeito do tratamento intraperitoneal com extrato de própolis na contagem total e diferencial das células peritoneais em camundongos imunossuprimidos infectados com <i>C. albicans</i>	48
Tabela	5	–Efeito do tratamento intraperitoneal com extrato de própolis na contagem total das células do baço e medula óssea em camundongos imunossuprimidos infectados com <i>C.albicans</i>	48
Tabela	6	–Efeito do tratamento do extrato de própolis na produção de citocinas no soro de animais infectados com <i>C. albicans</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Als: Adesinas de sequência de aglutinina, do inglês *Agglutinin like sequence*

A.U.: unidade arbitrária, do inglês *arbitrary unit*

CWPs: Proteínas de parede celular, do inglês *Cell wall protein*

C3/C5: Complemento 3 e 5

CD: Cluster de diferenciação, do inglês *Cluster of differentiation*

CR3: Receptor do complemento 3, do inglês *Complement receptor 3*

DC-SIGN: Não integrina ligadora de ICAM 3 específica de células dendríticas, do inglês *dendritic cell*

DL: dose letal

ERG: Efeitos reguladores do ergosterol

Hwp1: Proteína 1 de parede de hifas, do inglês *Hyphal wall protein 1*

Hyr1: Proteína reguladora *hyphally*, do inglês *regulatory protein hyphally*

ICAM 3: Molécula de adesão intercelular 3, do inglês *Intercellular adhesion molecule*

ILS: Aumento da expectativa de vida, do inglês *Increase life span*

MINCLE: Lectina dependente de Ca_2^+ indutível por macrófagos, do inglês *Macrophage inducible Ca_2^+ -dependent lectin*

MyD88: Diferenciação mielóide 88, do inglês *Myeloid differentiation*

MST: Média do tempo de sobrevivência, do inglês *Median time survival*

NF- κ B: Fator de Nuclear- kappa B, do inglês *Nuclear Kappa fator*

PMCL: linhagem de macrófagos de cavidade peritoneal, do inglês *Peritoneal macrophage cavity lineage*

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão, do inglês *Pattern Recognition Receptors*

RAF1: Fibrosarcoma rapidamente acelerado, do inglês *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

RNA_m: RNA mensageiro

Saps: Secretora de proteinase aspártica, do inglês *Secretory aspartic proteinases*

TNF: Fator de Necrose Tumoral, do inglês *Tumor necrosis factor*

TIR: Receptores de Interleucina 1, do inglês *Interleukin receptors*

TLR: Receptores do tipo Toll, do inglês *Toll like receptors*

UFC: Unidade formadora de colônia

WHO: Organização mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*

YPD: Extrato de levedura, peptona e dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Biologia de <i>Candida</i>	16
2.2	Resposta imune à infecção por <i>Candida albicans</i>	20
2.3	Relevância clínica de <i>Candida</i>	24
2.4	Tratamentos disponíveis para <i>Candida spp</i> e resistência aos antifúngicos..	28
2.5	Potencial Biológico de Própolis	32
2.5.1	Própolis verde	32
2.5.2	A ação da própolis verde em espécies de <i>Candida</i>	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Animais	37
4.2	Preparação do Extrato Padronizado de própolis de <i>Apis melífera</i>	37
4.3	Infecção por <i>Candida albicans</i>	37
4.4	Avaliação da sobrevida dos animais	38
4.5	Avaliação de Parâmetros Imunofisiológicos	38
4.5.1	Avaliação de Parâmetros Hematológicos.....	39
4.5.2	Quantificação de células peritoneais e de células dos órgãos linfoides.....	39
4.5.3	Quantificação das unidades formadoras de colônias fúngicas (CFU).....	39
4.5.4	Determinação da produção ex-vivo de óxido nítrico (NO).....	39
4.5.5	Quantificação de citocinas pelo método de CBA (<i>Cytometric bead arrays</i>).....	40
4.5.6	Ensaio de imunofenotipagem.....	40
4.6	Avaliação da ativação de macrófagos <i>in vitro</i>	41
4.6.1	Isolamento e cultura de macrófagos.....	41
4.6.2	Ensaio de fagocitose.....	41
4.6.3	Extração de RNA e RT-PCR semiquantitativo.....	41
4.6.4	Western Blotting.....	42
4.7	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43

5.1	Aumento da sobrevivência de camundongos imunossuprimidos e tratados com extrato de própolis.....	43
5.2	Efeito do tratamento com extrato de própolis nos parâmetros hematológicos de animais infectados <i>C.albicans</i>	44
5.3	O tratamento com própolis reduziu o número de unidades formadoras de colônia (CFU) de <i>C. albicans</i> no lavado peritoneal e no baço.....	46
5.4	Extrato de própolis aumenta o recrutamento de leucócitos em animais infectados com <i>Candida albicans</i>	47
5.5	Efeito do extrato de própolis distribuição de linfócitos em animais infectados por <i>C.albicans</i>	47
5.6	Produção de óxido nítrico em células peritoneais.....	48
5.7	Efeito do extrato de própolis na produção de citocinas no soro de camundongos imunossuprimidos e infectados com <i>C.albicans</i>	49
5.8	Extrato de Própolis induz aumento de fagocitose.....	50
5.9	Extrato de própolis não induz aumento de expressão de Dectina-1 e Receptor de Manose.....	50
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de infecções fúngicas invasivas têm aumentado desde os anos 1980, especialmente, na grande população de pacientes imunocomprometidos e/ou aqueles hospitalizados com doenças sérias e debilitantes. A morbidade e mortalidade dessas infecções são substanciais. Os fungos patogênicos mais comuns continuam sendo as espécies de *Candida* e *Aspergillus*. A taxa de mortalidade associada com a candidíase invasiva é de aproximadamente 0,6 mortes por 100.000 indivíduos/ano, enquanto que no caso da aspergillose esse número foi de 0,25 por 100.000 em 2003, nos Estados Unidos (ESPINEL-INGROFF et al., 2005; GUINEA, 2014), das espécies de *Candida* encontradas nas infecções sistêmicas, a prevalência é de *Candida albicans*, correspondendo a 62,3% das cepas (KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

O tratamento clínico de infecções causadas por *C. albicans*, no momento, se dá pelo uso de antibióticos poliênicos, derivados azólicos, alilaminas/tiocarbamatos, fluoropirimidinas e equinocandinas. No entanto, os mesmos ainda deixam muito a desejar quanto aos requisitos médicos, especialmente, pela alta toxicidade e o conseqüente número de efeitos colaterais indesejáveis. Também tem sido descrito um número crescente de microrganismos resistentes aos azóis e as equinocandinas (LOTZ; BRUNNER; RUPP, 2007; WHO, 2014).

A descoberta de novos fármacos a partir de produtos naturais conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente, ou então, serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos. Estima-se, que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais, ou foram desenvolvidos a partir deles (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Produtos naturais são uma fonte promissora na busca de novos princípios ativos, que possam ser utilizados como terapia alternativa no tratamento de infecções oportunistas, causadas por *Candida*, quando organismo se torna debilitado, ou imunocomprometido (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Dentre esses produtos naturais, a própolis tem sido um dos produtos mais investigados.

A própolis é produzida a partir de substâncias e exsudatos existentes nas espécies vegetais, em que se adicionam secreções próprias, visando a obtenção de um material maleável e balsâmico, dotado de “atividade antibiótica natural” para a proteção da colmeia frente aos agentes agressores, como fungos, bactérias, vírus, insetos, dentre outros. A

composição da própolis varia em função da região de origem, mas de modo geral, estão presentes os compostos flavonoides, como quercetina, aromadendrina, pinocembrina, etc., compostos fenólicos, com destaque para o artepelin C, baccharina e drupanina, no caso da própolis verde, além de ácidos como p-cumárico, caféico, ferúlico, benzóico, dentre muitos outros (LEITÃO et al., 2004).

Tendo em vista a grande variabilidade encontrada nos diversos tipos de própolis, mesmo entre aquela produzida pelas abelhas de *Apis mellífera*, surgiu a necessidade de realizar a padronização de um extrato de própolis. Esta preocupação levou a empresa Apis Flora Ltda, parceira deste projeto, a realizar essa padronização em relação aos aspectos vegetais, químicos e biológicos do extrato. O extrato padronizado de Própolis (EPP-AF®), empregado no presente estudo, demonstrou atividade anti-inflamatória (HORI et al., 2013), antimicrobiana e cicatrizante (BARUD et al., 2013; BERRETTA et al., 2013), antifúngica (DE CASTRO et al., 2011), dentre outras, e já teve sua segurança demonstrada por Reis et al. (2000), determinaram que a DL50 foi maior que 3000mg/kg p.c., por via oral, além de não ser um produto citotóxico, nem apresentar potencial mutagênico por via oral (TAVARES et al., 2007).

As recentes descobertas sobre o mecanismo de ação antifúngica do extrato padronizado de própolis distinto e inédito em relação aos demais antifúngicos clássicos (DE CASTRO et al., 2011), bem como o efeito anti-inflamatório decorrente da imunoregulação estudado em modelo local ou sistêmico (MACHADO et al., 2012). Desse modo, levou à hipótese de que o extrato padronizado de própolis reverte a imunossupressão e melhora o estado clínico dos animais com sepse induzida por *C. albicans*.

Os dados obtidos neste trabalho, foram submetidos ao periódico *Frontiers in Immunology*, seção *Inflammation* (Qualis A1; Fator de impacto 5,69). Nesse artigo foi demonstrado que o extrato de própolis aumenta a expectativa de vida em modelo experimental de infecção por *Candida albicans*, reduzindo o número de unidades formadoras de colônia dos fungos, através da ativação da resposta imunológica, podendo tornar-se uma terapia alternativa de paciente imunossuprimidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biologia de *Candida*

O gênero *Candida* está compreendido no reino *Fungi*, divisão Eumycota, classe *Saccharomycetes* família *Saccharomycetaceae*. Encontrados associados principalmente, com plantas, vegetação em putrefação, em insetos que se alimentam de plantas ou comida, e as diferentes espécies encontradas são caracterizadas primariamente, pelos requisitos de crescimento e fatores de virulência, diferenças fenotípicas, com relação à morfologia, dimensão e composição celular (DANIEL; LACHANCE; KURTZMAN, 2014; NEVILLE; D'ENFERT; BOUGNOUX, 2015).

As espécies do gênero *Candida*, são predominantemente leveduriformes. Eles se dividem por brotamento sem morfologia celular distinta, e são capazes de formar pseudohifas, morfologia denominada dimórfica e, polimórfica, possuindo a capacidade de formar leveduras, pseudohifas e hifas verdadeiras (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

A transição que separa células leveduriformes das formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas) é regulada por uma série de fatores ambientais que influenciam na morfologia de *Candida* (Figura 1). O crescimento de leveduras de *C. albicans*, por exemplo, ocorre predominantemente com pH baixo (<6), enquanto que em pH alto (>7) o crescimento é predominantemente em hifas (KIM; SUDBERY, 2011). Além disso, a presença de *N*-acetolglucosamina, CO₂ e mecanismo de transdução de sinais e fatores de transcrição, desempenham importante papel na regulação da morfogênese, que influenciam na transformação morfológica representando um importante fator de virulência (ALVAREZ; KONOPKA, 2007; HUANG, 2012).

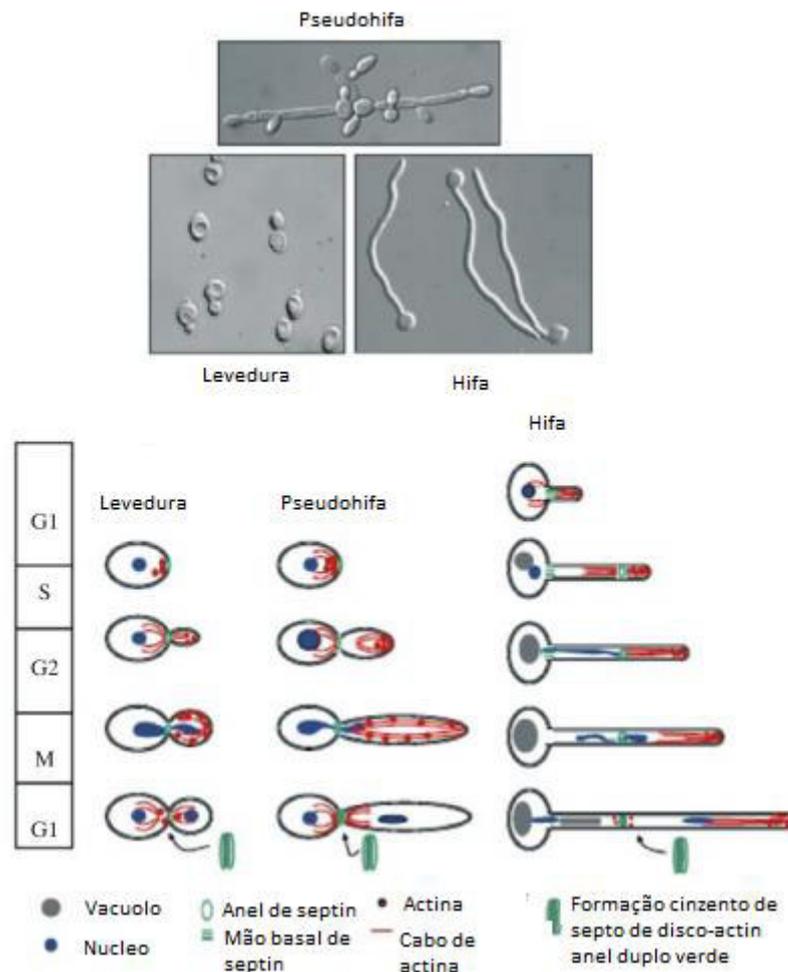


Figura 1. Fases morfológicas do ciclo de *Candida albicans*. Fonte: Kim e Sudbery (2011).

Assim como outros patógenos microbianos, a capacidade de *C. albicans* de aderir às superfícies hospedeiras é um pré-requisito para a colonização bem-sucedida e persistência durante a infecção. A maioria das infecções por *C. albicans* está associada à sua capacidade de formar biofilmes no tecido do hospedeiro ou superfícies abióticas (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; NETT; ANDES, 2006; TOURNU; VAN DIJCK, 2012;). Os biofilmes são comunidades estruturadas de populações microbianas associadas à superfície, incorporadas em uma matriz de polissacáridos extracelulares, proposta para fornecer proteção às células do biofilme (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). As células incorporadas ao biofilme de *C. albicans*, proporcionam um ambiente estável em que são protegidas do sistema imune do hospedeiro e podem tolerar concentrações extremamente elevadas de mediadores antimicrobianos (TAFF, 2014).

Vários fatores e propriedades de virulência são atribuídos a invasividade de *Candida*, e são conhecidos por promover a formação de biofilme e sua persistência no hospedeiro. A propriedade de transição morfológica, como os diferentes estágios morfológicos (leveduras,

pseudohifas e hifas) são responsáveis pela colonização, crescimento e disseminação (SAVILLE et al., 2003).

A forma de levedura tem sido associada tanto à adesão inicial como à disseminação, enquanto que a forma de hifas filamentosas permite que *C. albicans* forme um biofilme e invada o tecido hospedeiro (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). Outra propriedade importante é a capacidade de *Candida* em produzir várias enzimas excretadas extracelularmente, como lipases, esterases e aspartil proteinases segregadas (Saps), bem como hemolisinas, envolvidas na invasão de tecidos hospedeiros e na aquisição de nutrientes (HOYER, 2001).

Além disso, a propriedade de virulência mais importante é a adesão mediada por adesinas de parede celular; mais notável são as da família de sequências de tipo aglutinina (*Als*) e uma proteína de parede de hifa (*Hwp1*) que é crucial para a ligação de *C. albicans* a receptores em tecidos hospedeiros (NAGLIK et al., 2004; WILLIAMS; LEWIS, 2011) (Figura 2).

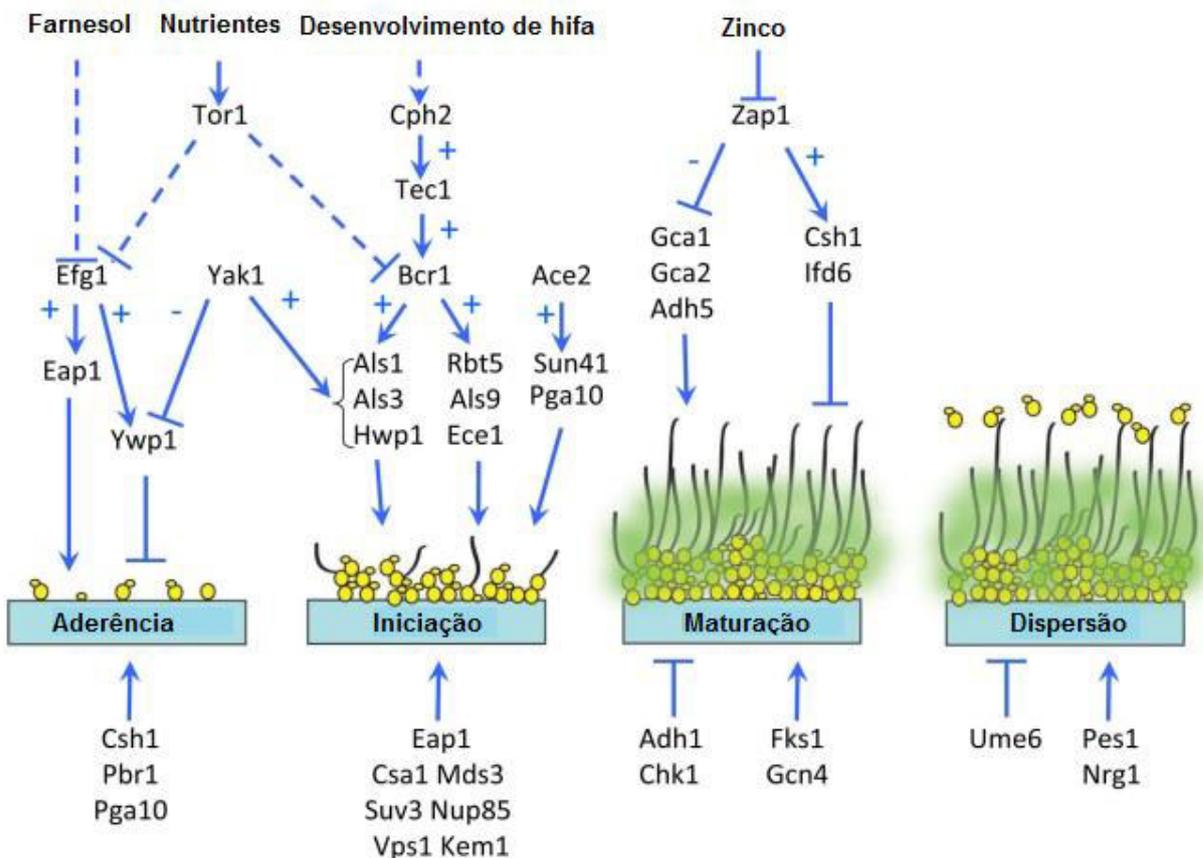


Figura 2. Função gênica na formação de biofilme. Fonte: Findel (2011).

Quanto à estrutura celular, as espécies de *Candida* apresentam parede celular bem definida, com similaridade quanto à composição - quitina, polissacarídeos e proteínas-, no entanto, as variações nas proporções desta composição são visíveis entre as diferentes espécies (HUANG, 2012; WHIBLEY; GAFFEN, 2015). *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*, por exemplo, apresentam quantidade maior de quitina nas paredes quando comparadas a *Candida krusei* e *Candida glabrata*, entretanto, esta espécie apresenta 50% a mais de proteínas, mananas e menos glucanos do que *C.albicans* (COSTA-DE-OLIVEIRA et al., 2013).

A parede celular de *C. albicans* é composta por hidratos de carbono e proteínas da parede celular (CWPs), uma estrutura externa que define a forma e fornece a resistência física da célula fúngica, sendo uma barreira eficiente contra reações imunitárias humanas, além de proteger do *stress* ambiental, como a pressão osmótica (GOW; HUBE, 2012; LUO et al., 2013). A parede celular do fungo representa, portanto, um alvo imunológico importante devido aos Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs), que podem ativar e modular as respostas imunes (NETEA et al., 2008; ROMANI, 2011).

A parede de *C. albicans* apresenta duas camadas distintas: uma camada externa composta de glicoproteínas e uma camada interna, que contém um esqueleto de polissacarídeos (Figura. 3). A porção de hidratos de carbono, é de cerca de 80-90% com a camada externa, predominantemente constituída por polímeros de *O*-e *N*-manoses (mananas) que estão covalentemente associadas com proteínas para formar glicoproteínas. A expressão da camada de glicoproteína é altamente regulada durante a transição de levedura a hifa e, os genes que codificam essas proteínas específicas de transição para a forma de hifas são: a proteína da parede de hifas 1 (Hwp1); proteína reguladora *hyphally* (Hyr1) e adesinas de sequência de aglutinina-3 (Als3), como as isoenzimas proteases aspárticas (SAPs). CWPs das hifas são os principais antígenos específicos, e também funcionam como adesina e invasina que podem modular a resposta imune (GOW et al., 2011).

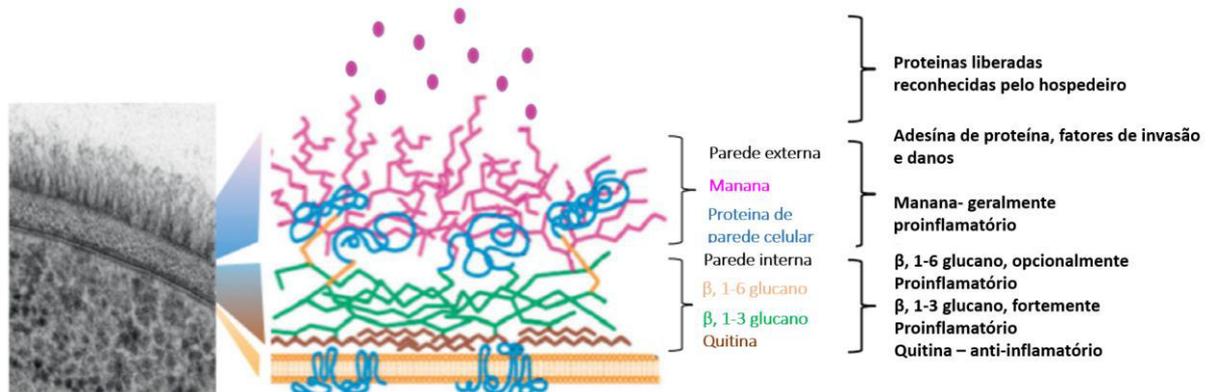


Figura 3. Estrutura da parede celular de *C. albicans*. Fonte: Gow et al. (2012).

Aproximadamente 314 espécies de *Candida* têm sido descritas, e 92 % causam candidemia (DANIEL; LACHANCE; KURTZMAN, 2014). Dentre as espécies de maior importância médica estão: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. Destas, a mais comum, frequentemente isolada e mais virulenta ao homem, é *C. albicans* (GUINEA, 2014).

Candida albicans é um fungo oportunista que coloniza de modo comensal na microbiota gastrointestinal, vaginal, mucosa oral e na superfície da pele (JABRA-RIZK et al., 2016) de aproximadamente 50% dos indivíduos saudáveis (BROWN, 2012; KULLBERG; ARENDRUP, 2015; NETEA et al., 2015; SUDBERY, 2011). Nesses vários locais de colonização por *C. albicans*, a sua proliferação é controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro e a resistência à colonização é proporcionada por outros membros da microbiota (JABRA-RIZK et al., 2016).

No entanto, as interrupções no sistema imune do hospedeiro, função de barreira ou microambiente local (incluindo composição de microbiota) podem levar a alterações no crescimento e fisiologia de *C. albicans* (gene/expressão protéica, metabolismo, morfologia), ambos mediados por micróbios e/ou mediados por hospedeiro que podem causar danos. Dependendo da magnitude dos danos, ocorre a doença, que pode ser aguda e/ou recorrente por natureza (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; NAGLIK et al., 2011; PIROFSKI; CASADEVALL, 2009).

2.2 Resposta imune à infecção por *Candida albicans*

O primeiro passo para uma efetiva resposta imune anti-*Candida*, é o reconhecimento do fungo pelo sistema imune inato. Nos últimos anos, tem havido um entendimento de como receptores de reconhecimento de padrões ligados à membrana (PRRs), reconhecem vários

PAMPs de levedura e formas filamentosas de *Candida* (HA et al., 2011; KULLBERG et al., 1999).

Sabe-se que alguns componentes do sistema complemento, C3 e C5, o receptor de complemento 3 (CR3), bem como os receptores de tipo Toll (TLR) -2 (em interação com TLR1 e TLR6), TLR4, TLR7, e TLR9, as lectinas do tipo C (CLRs) como a dectina-1 e dectina-2, os receptores de manose dos macrófagos (MMR), não integrina ligadora de ICAM3 específica de células dendríticas (DC-SIGN), e macrófago induzido por lectina tipo C (Mincle) estão entre PRRs dos PAMPs fúngicos incluindo, manana, β -glucano, RNA e DNA (Figura 4) (NETEA et al., 2015).

Vários destes PRRs são indispensáveis para a resposta do hospedeiro *in vivo*, uma vez que, medeiam a indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, e a modulação da resposta imune inata e adaptativa antifúngica. De fato, interações sinérgicas entre diferentes PRRs, resultando na ativação imunológica, foram demonstradas, por exemplo, entre os receptores de TLRs e CLRs, ou C5a e TLRs (LUO et al., 2013).

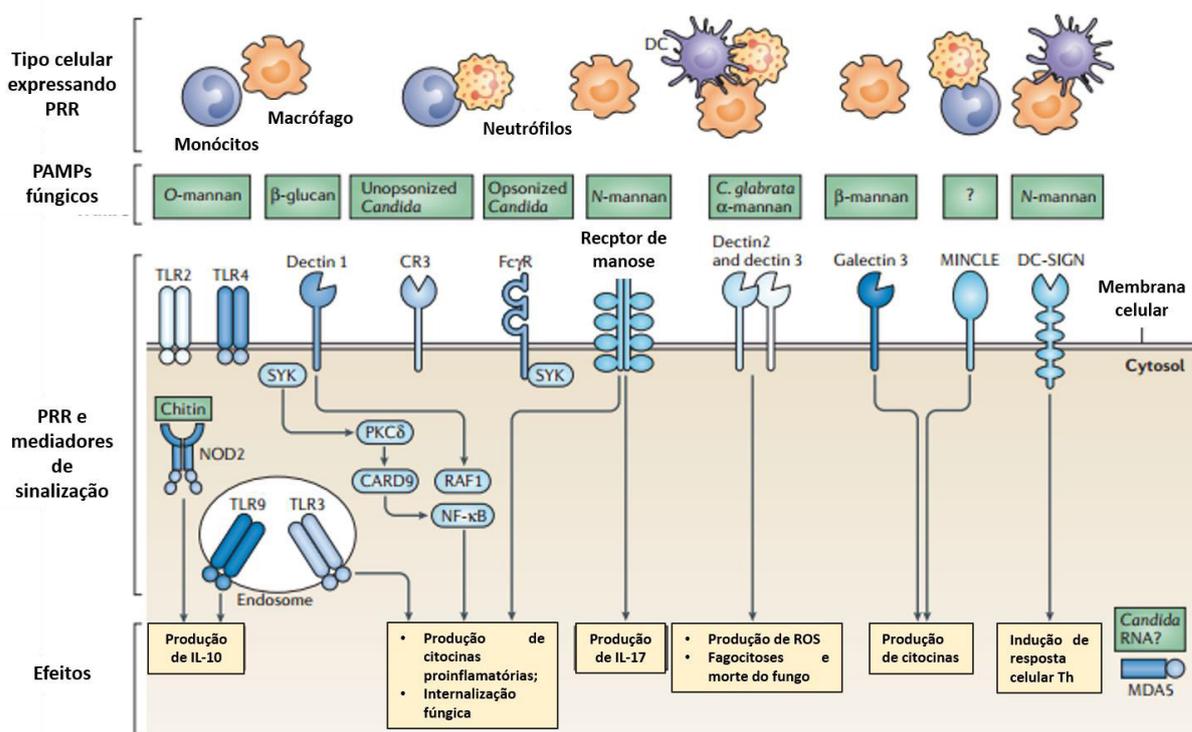


Figura 4. Reconhecimento de *Candida albicans* por células da imunidade inata. Fonte: Netea et al. (2015a).

Os receptores do tipo Toll são responsáveis pelo reconhecimento de diversas estruturas microbianas. Além disso, os TLRs citoplasmáticos, receptores de interleucina 1 (TIR) e MyD88 são responsáveis pela indução de respostas intracelulares. Os principais TLRs

para reconhecimento de *C. albicans* são do tipo 2 e 4 (GIL; GOZALBO, 2006a;b). Esses dois tipos de Toll, estão envolvidos na indução da produção de citocinas próinflamatórias e proteção do hospedeiro (NETEA et al., 2004).

O ligante de β -glucano que tem sido mais estudado é a dectina-1 (*Clec7a*), um CLR expresso em neutrófilos e principalmente em monócitos/macrófagos, que induz produção de citocinas, bem como a internalização do fungo por “sinapse fagocítica”. A dectina-1 induz a sinalização intracelular por meio de um adaptador de recrutamento de caspase contendo domínio de proteína 9 (CARD9) ou do fator nuclear- κ B (NF- κ B) por meio da sinalização RAF1 (GALÈS et al., 2010; STRASSER et al., 2012). Além de induzir uma resposta direta, a dectina-1 amplifica a resposta de TLR2 e TLR4, bem como impede a liberação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) descontrolada durante a infecção (BRANZK et al., 2015).

Outro importante PAMP são as mananas, que são os reconhecidos por vários CLRs, incluindo receptor de manose (MMR), dectina-2, DC-SIGN e Mincle. Os MMR são principalmente expressos em macrófagos e reconhecem *N*-manana de *Candida*. A sinalização via MMR, tem um papel importante na expressão de citocinas próinflamatórias, principalmente IL-17. A dectina-2, por sua vez, está presente em células dendríticas, macrófagos e neutrófilos e o reconhecimento de manose interage com receptor $Fc\gamma R$ para induzir produção de fator de necrose tumoral (TNF) em resposta a hifas de *C. albicans*. Além disso, a dectina-2 tem sido associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e recrutamento e ativação de fagocitose em neutrófilos durante o percurso da infecção (SAIJO; IWAKURA, 2011).

Após o reconhecimento inicial de PAMPs pela variedade de PRRs, diversos mecanismos efetores são iniciados pela resposta imune. As células epiteliais, que constituem uma barreira para invasão fúngica, respondem as espécies de *Candida* por meio de mecanismo dependente de TLR4, ativando NF κ B e JUN, conhecido como ativador de proteína 1 (AP-1). Em decorrência da mudança morfológica de levedura e ativação de fator de transcrição Epg1 para hifas, ativa MAPK1 (mitógeno ativado por proteína kinase 1) e sinalização via FOS em células epiteliais, um mecanismo que permite a detecção da invasão tecidual (Figura 5) (MOYES et al., 2011).

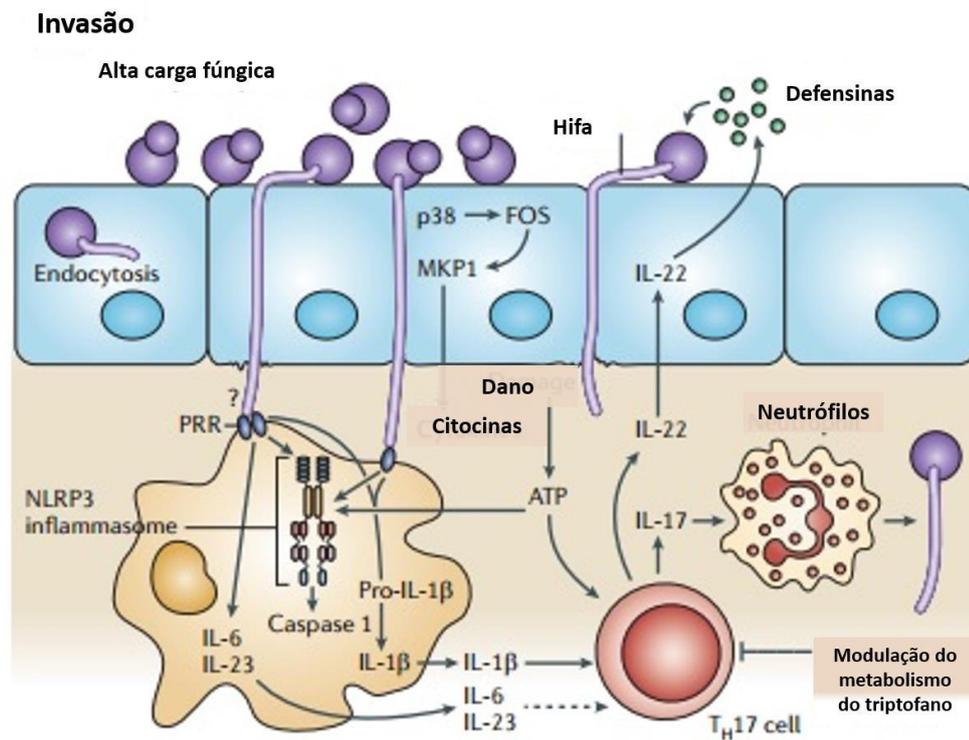


Figura 5. Invasão do epitélio por *Candida albicans*. Fonte: Gow e Hube (2012).

A interação inicial via PAMPs, ocorre a fagocitose de *Candida*, que é mediada pela ativação de componentes celular e humoral do sistema imune inato. Os componentes humorais envolvidos na resposta antifúngica são representados pelo complemento e pela proteína ligante de manose (MBL). A ligação e ativação do complemento são mediados pela via alternativa, e ativação do complemento é muito importante principalmente, para quimiotaxia e opsonização do fungo, mas não para a lise (BROWN, 2011).

As populações celulares mais importantes envolvidas na fagocitose e, consequentemente, na morte, de fungos patogênicos, são neutrófilos e macrófagos. Como descrito anteriormente, macrófagos após reconhecimento de PAMPs, ativam inflamassoma tanto pela via NLRP3/caspase-1 como pela via não canônica de caspase-8, tendo como consequência a produção de IL-1β, importante para o recrutamento adicional de fagócitos no sítio da infecção (LEFÈVRE et al., 2010; LIONAKIS; NETEA, 2013; WANG, 2015).

A relevância de macrófagos para a respostas anti-*Candida* é demonstrada por estudos *in vivo*, em que a depleção de macrófagos em camundongos, os tornam mais susceptíveis a infecção sistêmica por *Candida* (CHENG et al., 2012). No entanto, um estudo com depleção de monócitos sugeriu que, camundongos com monocitopenia são igualmente susceptíveis a camundongos controle, reforçando o papel dominante desempenhado pelos polimorfonucleares (LIONAKIS, 2013). Entretanto, a depleção neutrofílica no sangue não

inibe o crescimento de *Candida*, tendo papel importante na eliminação do fungo (NETEA et al., 2015).

A morte de *Candida* por neutrófilos ocorre por ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que eliminam micróbios fagocitados quando os grânulos que os contêm se fundem com o fagossoma. Além das ROS, neutrófilos usam mecanismos não oxidativos para eliminar *Candida*, tais como fatores antimicrobianos como lisoenzimas, lactoferrina, elastase, β -defensinas, gelatinases e catepsina G (FUTOSI; FODOR; MÓCSAI, 2013; MIRAMÓN et al., 2012).

O papel antifúngico da elastase e catepsina G têm sido associado à sua capacidade de neutralizar e de impedir a formação de hifas, formas grandes difíceis de serem fagocitadas. A calprotectina, por sua vez, componente identificada nas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), induz à liberação de substâncias antimicrobianas (mieloperoxidase, lactoferrina, azurocidina e catelicidina) a partir de grânulos de neutrófilos. A proteína 3, derivada dos neutrófilos, clivam catelicidina no peptídeo cAMP, que promove ruptura da membrana da célula fúngica, inibe a formação de biofilme e adesão fúngica, reforça a quimiotaxia e a produção de ROS e inibe a apoptose neutrofílica (BYRD et al., 2013; URBAN et al., 2006).

Quando ocorre o desequilíbrio do sistema imune, ou o balanço da flora normal é interrompido, as espécies de *Candida* podem se tornar patogênicas, causando frequentemente, doenças recorrentes em indivíduos susceptíveis. Como resultado, as infecções por *Candida* são conhecidas como um sério desafio de saúde pública com alta importância médica e socioeconômica (KIM; SUDBERY, 2011; CORNISTEIN et al., 2014).

2.3 Relevância clínica de *Candida*

A incidência atual de candidíase invasiva permaneceu nos últimos anos, ou mesmo reduziu na Austrália, Canadá, Europa e Estados Unidos, no entanto, a incidência está crescendo continuamente, na América Latina e no resto do mundo (QUINDÓS, 2014). Embora a epidemiologia da candidemia na América Latina não tenha sido estudada profundamente, Nucci et al. (2013), demonstraram que em 22 hospitais de 8 países da América Latina, a incidência de candidemia era de 0,98 episódios por 1000 admissões hospitalares. No Brasil, a taxa de mortalidade de candidemia é superior a 50 % quando comparados a 44,8 % nos EUA (ANDES et al., 2016; BERGAMASCO et al., 2013; DOI et al., 2016).

Espécies de *Candida* apresentam uma versatilidade no que se diz respeito ao potencial patogênico e as infecções mais comuns por *Candida* ocorrem em superfícies de mucosas e incluem vulvovaginites e candidíase orofaríngea. No caso de vulvovaginite, *Candida* spp. é a segunda causa mais comum nos Estados Unidos, e a maioria das mulheres (aproximadamente 75%) tem pelo menos, uma vez na vida, podendo ter até 8% de infecções recorrentes (PETERS et al., 2014a).

Candidíase vulvovaginite (CVV), é caracterizada por prurido, ardor, dispareunia e pela eliminação de corrimento vaginal em grumos. Frequentemente, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes, acompanhada por ardor e sensação de queimaduras (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Embora seja facilmente tratada com antifúngicos e a infecção pode ser normalmente controlada, aproximadamente 8% das mulheres acometidas sofreram de infecções recorrentes, necessitando de terapia antifúngica contínua (JABRA-RIZK et al., 2016; LIU et al., 2013).

Alguns dos fatores que levam à predisposição para a infecção primária de CVV incluem o uso de anticoncepcionais com alta dose de estrogênio, antibiótico, terapia de reposição hormonal e diabetes mellitus (SOBEL et al., 2011). Candidíase Vulvovaginite recorrente (CVVR) é considerada idiopático, embora CVV e CVVR tenham mecanismos patogênicos possivelmente identificados, e por não estarem associados com imunodeficiência, mas, sim, com resposta inflamatória local, qualificando *C.albicans* no contexto de grandes infecções (SOBEL, 2016).

Semelhante a outros locais do corpo expostos a patógenos, o ambiente cervico-vaginal está preparado para ativar a imunidade inata e expandir a resposta adaptativa para controlar, se não eliminar o microrganismo. Consequentemente, na vagina encontram-se fatores celulares e humorais como células dendríticas, bem como linfócitos T-helper, reguladores e citotóxico, linfócitos B e células *natural killer* (NK), produzindo citocinas e quimiocinas que podem ajudar no recrutamento de fatores defensivos de locais distante do foco da infecção (CASSONE, 2015).

A atividade desse arsenal imunológico centra-se nas células epiteliais vaginal, principal célula na resposta antimicrobiana, que constituem uma barreira mecânica com produção de muco superficial semelhante à queratina, mas também capaz de reconhecer o patógeno e responder pela ativação de células e secreção de mediadores imune direcionando a inflamação e resposta imune (PETERS et al., 2014b).

Complexos intracelulares, denominados inflamassomas, traduzem os sinais da presença dos patógenos e seus produtos de ativação imune, levam ao recrutamento de

polimorfonucleares, a produção de citocinas, particularmente IL-1 β , IL-18, IL-23 e IL-17, e ativação de linfócitos T- *helper* e Th17 foram atribuídos como um papel anti-*Candida* importante (ARORA; et al., 2016; CASSONE, 2015) (Figura 6).

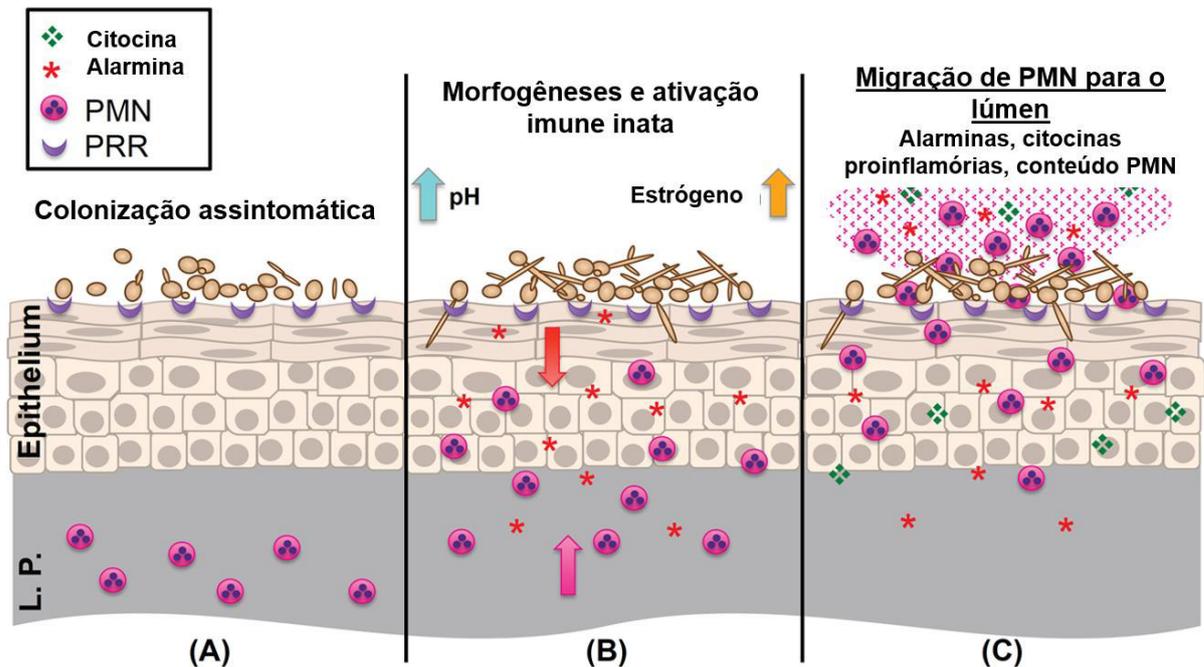


Figura 6. Imunopatogênese de vulvovaginite por *C. albicans*. Fonte: Peters et al. (2014).

Já na candidíase orofaríngea (OPC), engloba infecções da língua, da mucosa e assoalho da boca, podendo apresentar manchas avermelhadas (eritematosas) e, ou lesões brancas (pseudomembranas), sendo muito mais frequente quando associada a doenças, tais como diabetes, ou na disfunção imune, particularmente em indivíduos com vírus da imunodeficiência- HIV (FIDEL; NOVERR, 2012). Uma vez que, a redução da incidência de candidíase oral entre indivíduos infectados pelo HIV tenha desenvolvido no mundo, o aumento de infecções em paciente de órgãos transplantados, com neutropenia, pancreatite, insuficiência renal, ou seguido tratamento com glicocorticóides, indica também que são suscetíveis a infecções por *Candida* (LOPES et al., 2015; NETEA et al., 2015).

A suscetibilidade à candidíase oral em pacientes HIV/AIDS, levou à investigação dos mecanismos que causam defeitos na imunidade da mucosa em infecção por *C. albicans*, e tem sido mostrado com a diminuição da contagem de células de T CD4⁺ no sangue periférico (DE REPENTIGNY; GOUPIL; JOLICOEUR, 2015). OPC em indivíduos imunocomprometidos foi atribuído à mudança no padrão de resposta Th1 para Th2, caracterizado como não protetor em resposta a *C. albicans* (FIDEL, 2011).

Conti et al. (2009) questionaram que o padrão Th1 seja o principal responsável pela resposta na mucosa oral contra *Candida*. Camundongos *knockout* para IL12p40 e IL-23p19 eram deficientes de Th1 e suscetíveis a candidíase orofaríngea e apresentaram redução no recrutamento de neutrófilos na mucosa oral, mas que a produção de IL-17 por células Th17, foram induzidas rapidamente, após a infecção sendo este padrão de resposta na mucosa oral. Juntamente com esse perfil de resposta, neutrófilos e peptídeos microbianos produzidos por queratinócitos seria o principal mecanismo de resposta efetora anti-*Candida* (CONTI; GAFFEN, 2010; HUPPLER et al., 2015) (Figura 7).

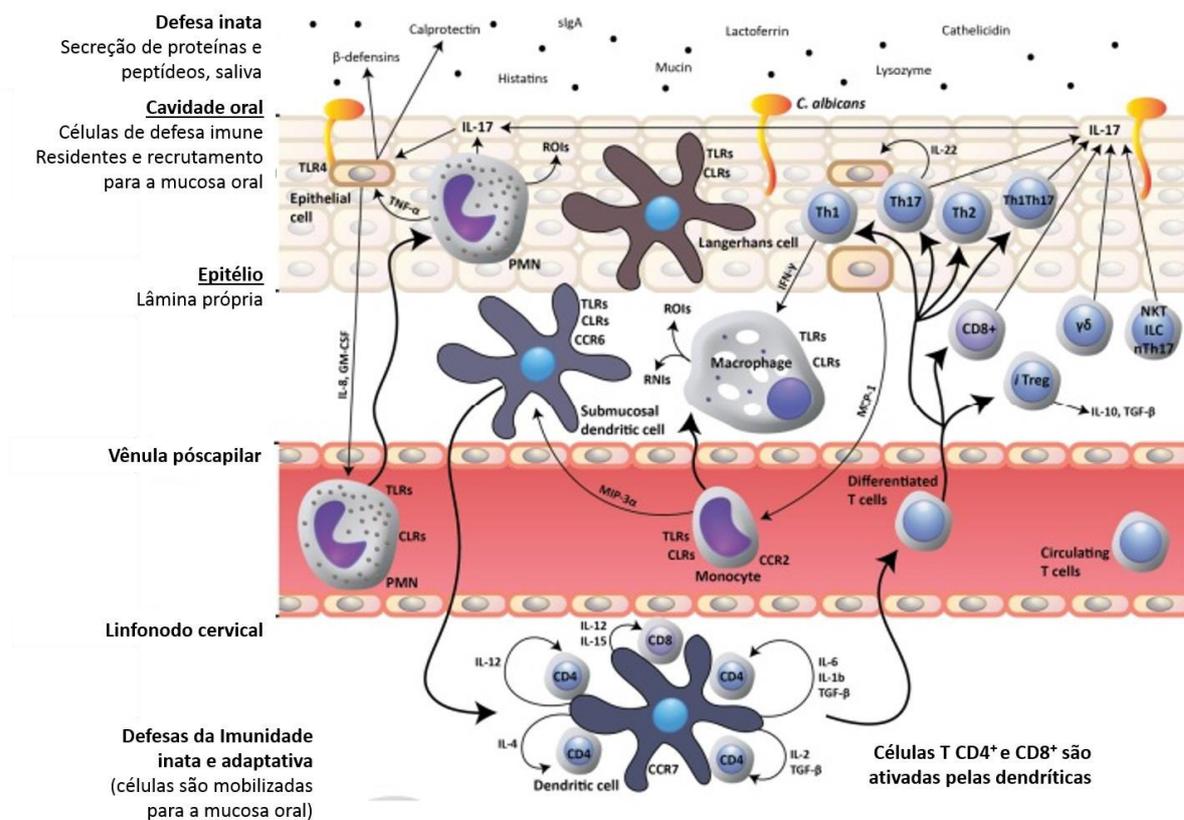


Figura 7. Resposta do hospedeiro para infecção oral por *Candida albicans*. Fonte: Repentigny et al. (2015).

Acredita-se, que fatores ambientais, como o uso de antibióticos e dietas restritas, podem causar alterações na microbiota e menor resistência à colonização, levam ao crescimento excessivo de *C. albicans* no trato gastrointestinal (GI) em humanos (GUNSALUS et al., 2015). Mais importante ainda, a colonização e infecção no GI, predispõem pacientes para candidíase sistêmica, que é conhecido como candidíase de origem endógena. Em modelo experimental, o inoculo intraperitoneal de *C. albicans* resulta em peritonite dentro de 6 horas, caracterizado pelo aumento do pH e influxo neutrofílico no

fluido peritoneal. A disseminação nos órgãos e a formação de abscessos foram evidentes entre 6 e 24 horas após a infecção (FIDEL; NOVERR, 2012).

Vários estudos experimentais e clínicos caracterizam o crescimento de *Candida albicans* no trato gastrointestinal como uma doença inflamatória exacerbada, promovendo hiper-reatividade local e sistêmica (HA et al., 2011). Em termos da imunidade inata, camundongos deficientes de progenitores de granulócitos que afeta macrófagos, polimorfonucleares são suscetíveis para candidíase GI (CANTORNA; BALISH, 1992; LIONAKIS; NETEA, 2013).

O tratamento com inibidor de síntese de óxido nítrico aumenta a severidade de infecção do trato gastrointestinal. Camundongos deficientes de óxido nítrico sintetase 2 (NOS2), são suscetíveis não somente para candidíase GI, mas também na disseminação e morbidade (BALISH et al., 2005).

Modelos experimentais de candidíase da mucosa, tem sido investigado para elucidar várias respostas imunes do hospedeiro durante o início e progressão de infecções por *Candida albicans*. A principal vantagem desses modelos, é que eles permitem manipulações genéticas e farmacológicas a fim de similar hospedeiros suscetíveis, contribuindo para o conhecimento e busca de novos agentes antifúngicos que minimizem as reações de resistência e toxicidade de medicamentos utilizados (MARTEL et al., 2010; WHO, 2014).

2.4 Tratamentos disponíveis para *Candida spp* e resistência aos antifúngicos

O tratamento clínico de infecções causadas por *Candida albicans*, no momento, se dá pelo uso de antibióticos poliênicos, derivados azólicos, alilaminas/tiocarbamatos, fluoropirimidinas e equinocandinas (WHO, 2014). No entanto, os mesmos ainda deixam muito a desejar quanto aos requisitos médicos, especialmente pela alta toxicidade e o conseqüente número de efeitos colaterais indesejáveis. Também tem sido descrito um número crescente de microrganismos resistentes aos azóis e as equinocandinas (LOTZ; BRUNNER; RUPP, 2007).

O termo polieno, designa um grupo de metabólitos anfotéricos de actinomicetos, são usadas em terapia a nistatina (obtida de *Streptomyces noursei*), substância encontrada em medicamentos de uso oral e vaginal, e a anfotericina B (ASZALOS et al., 1985). Os polienos não têm atividade antibacteriana, e sua utilidade terapêutica reside na ação antifúngica. São bastantes instáveis, pouco absorvidos pelo trato gastrintestinal e razoavelmente tóxicos quando administrados por via sistêmica. São insolúveis, propriedade esta, que os protege da

inativação o suficiente para permitir ação local no trato intestinal após administração oral (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os polienos atuam destruindo a integridade da membrana celular dos organismos suscetíveis, ação está que pode ter relação com sua ligação a esteroides na membrana e com a formação de poros aquosos (Figura 8) (SILVA et al., 2006). Esse mecanismo de ação explicaria a ausência de atividade antibacteriana, já que a membrana das bactérias não tem componente esteroidal. Esse mecanismo também pode explicar pelo menos uma parte das reações indesejáveis observadas no uso sistêmico dos polienos: anemia hemolítica, que pode resultar direta, ou indiretamente da alteração na formação ou na função das membranas dos eritrócitos, que contém colesterol (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

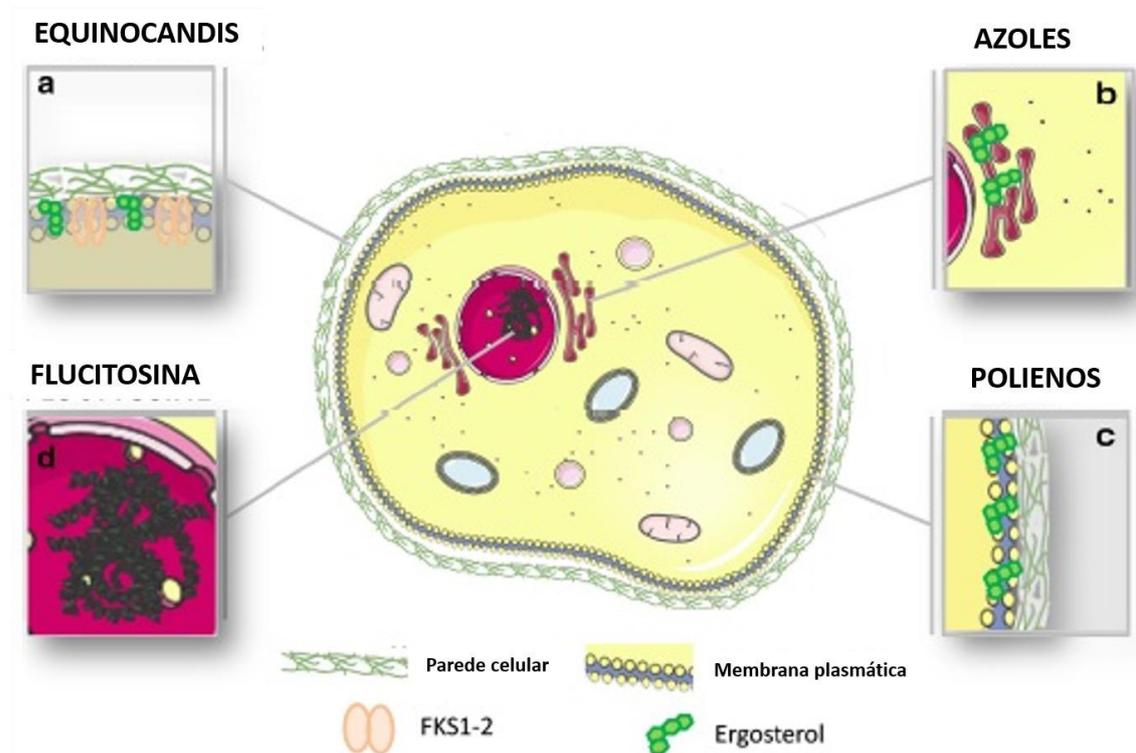


Figura 8. Local de ação de drogas antifúngicas. Maubon et al. (2014).

A anfotericina B é produzida por *Streptomyces nodosus* e pode ser utilizado topicamente, mas sua utilidade terapêutica especial consiste na administração intravenosa para o tratamento de infecções micóticas disseminadas e potencialmente letais, como blastomicose, candidíase sistêmica, coccidioidomicose e monilíase. Os polienos são menos ativos contra os dermatófitos, sendo usados topicamente só quando o provável agente patogênico é a *Candida*. Esse antibiótico é lentamente eliminado pelo corpo, sua meia-vida plasmática é de aproximadamente, 24 horas e a meia-vida de eliminação desse medicamento, que se liga fortemente às proteínas, é calculada em quinze dias (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Apesar de mais de 30 anos de uso clínico, uma resistência mínima à anfotericina B tem sido desenvolvido. No entanto, o problema principal associado com o uso profilático convencional de anfotericina B tem sido aos efeitos secundários bem conhecidos e toxicidade. Os efeitos colaterais envolvem febre, calafrio e hipotensão. A toxicidade mais observada no uso sistêmico da anfotericina B é a renal (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009; WHO, 2014).

Além dos antifúngicos naturais apresentados acima, há alguns agentes sintéticos de relevância clínica. Os compostos que contêm imidazol ou triazol, muitas vezes, são agrupados sob o nome de “azóis”. Esses grupos abrangem os imidazóis (miconazol, clotrimazol, econazol e cetoconazol) e os triazóis (itraconazol e fluconazol). Têm atividade antifúngica de amplo espectro, compreendendo os dermatófitos, a *Candida* e alguns dos organismos que causam micoses profundas. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da desmetilação do grupo 14- α -metila do lanosterol por se ligarem a uma enzima do citocromo P450, inibindo, assim, a síntese do ergosterol, esterol específico para as membranas fúngicas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

O cetoconazol é administrado por via oral. Sua absorção, assim como ocorre com outros azóis de uso oral, é drasticamente reduzida quando os pacientes estão tomando bloqueadores dos receptores H₂, além dos antiácidos. O cetoconazol distribui-se amplamente no corpo, incluindo pele e mucosas. É metabolizado no fígado e excretado sobretudo, na bile. Além dos efeitos colaterais sobre os hormônios, é comum observar-se anorexia, náusea e vômito (LOOSE et al., 1983). O fluconazol é administrado por via oral e intravenosa, atinge excelentes concentrações no líquido cefalorraquidiano e urina (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

A diminuição da susceptibilidade aos azóis em *Candida* spp, é mediada por dois mecanismos. Efluxo de drogas, é mediado por mutações de genes que codificam transportadores regulatórios da superfamília ligante de ATP (ABC), ou da superfamília de maior facilitador (MFS). Superexpressão do transportador ABC está associado com resistência cruzada a diversos azóis, enquanto que a super-expressão do transportador MFS se limita a resistência ao menos azóis (fluconazol, voriconazol) (MORIO et al., 2012).

Um segundo mecanismo, é a superprodução da enzima alvo Erg11p. As substituições de aminoácidos em Erg11p podem diminuir a afinidade dos fármacos para essa enzima. Além disso, as mutações Erg3 estão associadas com resistência cruzada a azóis através de um desvio metabólico, que conduz à síntese de fecosterol, que é capaz de substituir o ergosterol. Outras alterações genéticas podem diminuir a susceptibilidade dos azóis. Aneuploidia,

aumenta o número de cópias de genes envolvidos na resistência desse composto em *C. albicans* (MARTEL et al., 2010).

O rápido desenvolvimento da resistência e a toxicidade de compostos antifúngicos existentes têm chamado a atenção para a atividade antimicrobiana de produtos naturais. O pequeno número de medicamentos disponíveis para o tratamento de fungos, a maioria deles são fungistáticos, e a emergente resistência aos agentes antifúngicos incentiva a procura de tratamentos alternativos (LEWIS; VIALE; KONTOYIANNIS, 2012).

2.5 Potencial Biológico de Própolis

No Brasil, bem como em outras partes do mundo, produtos naturais têm sido uma rica fonte de compostos para a descoberta de novos medicamentos. Entre esses produtos, a própolis é cada vez mais popular e amplamente utilizada em alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos (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, incluem minerais e ácidos fenólicos (cinâmico e o cafeíco), ou seus estéres, flavonóides, terpenóides, esteróides, açúcares e aminoácidos (BANKOVA, 2005; BARLAK et al., 2011).

A composição de uma própolis é determinada principalmente, pelas características fitogeográficas como tipo de vegetação, estação do ano e das condições ambientais existentes próximas à colmeia, que levará também a uma variação das atividades farmacológicas e consequentemente, do sinergismo entre os diversos compostos químicos (SFORCIN et al., 2001; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado ações biológicas e farmacológicas de diferentes amostras de própolis de todo o mundo (KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013). Devido as propriedades medicinais, própolis tem efeito no tratamento de infecções, como antiviral, antisséptico (KUJUMGIEV et al., 1999), antisséptico, antibacteriano, antifúngico de própolis de *Apis melífera*, *Melipona fasciculata* (BARUD et al., 2013; LIBERIO et al., 2011; SFORCIN et al., 2001), adstringente, antiespasmódico (KUROPATNICKI; SZLISKA; KROL, 2013), antiulceroso de própolis verde (LOTFY, 2006; REIS et al., 2000), anti-inflamatório e imunomoduladora de *Scaptotrigona aff. postica* e *Apis melífera* (ARAUJO et al., 2011; FARIAS et al., 2014; MACHADO et al., 2012) e anti-leishmania, antiprotozoário de própolis verde (SALOMÃO et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

2.5.1 Própolis verde

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 (SALATINO et al., 2005; SFORCIN et al., 2001).

Tanto em modelos experimentais quanto em humanos, própolis não apresenta efeitos colaterais (CUESTA et al., 2005; JASPRICA et al., 2007; SFORCIN et al., 2001). Em camundongos, a DL50 varia entre 2 a 7.3 g/kg enquanto em humanos, a dose sugerida é de 1,4 mg/kg, ou aproximadamente 70 mg/dia (BURDOCK, 1998).

O efeito imunomodulador da própolis verde foi investigado por Bachiega et al. (2012), com base na 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 foi observado com a IL-10. A própolis modulou a resposta imune/inflamatória de acordo com a concentração empregada, e 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, assim, que a própolis pode se comportar como pró ou antiinflamatória conforme a dose.

A própolis verde também foi investigada quanto à expressão dos receptores tipo Toll, compostos essenciais para o reconhecimento microbiano e desenvolvimento da resposta imune adaptativa. O tratamento com a própolis, via oral, produziu aumento na produção basal de IL-1 β e na expressão de TLR-2 e TLR-4 em macrófagos peritoneais. A expressão de TLR-2 e TLR-4 e a produção de IL-1 β e IL-6 também apresentaram valores aumentados em splenócitos de camundongos tratados com a própolis (ORSATTI et al., 2010). Esses dados sugerem que a administração da própolis em curto prazo em camundongos pode estimular os eventos iniciais da resposta imune. A própolis não afetou a expressão e produção de IL-2, IL-4 e IL-10, contudo, a produção basal e estimulada de IFN- γ foi inibida após a administração

da própolis, o que sugere seu efeito anti-inflamatório *in vivo* (PAGLIARONE et al., 2009a, 2009b).

Benkovic et al. (2009), avaliaram o efeito radioprotetor de extrato aquoso de própolis, ácido caféico, crisina e naringenina em células brancas humanas *in vitro*. Os resultados obtidos pelo ensaio alcalino cometa indicaram perfis satisfatórios de toxicidade e confirmaram as habilidades protetoras da própolis e dos compostos fenólicos investigados. As amostras avaliadas não mostraram genotoxicidade e ofereceram proteção contra o dano ao DNA.

Em monócitos humanos, o extrato de própolis exerce um efeito estimulador sobre essas células auxiliando na resposta antifúngica, sendo esse efeito potencializado quando incorporado em microesferas (POSSAMAI et al., 2013). Um potencial composto isolado do ácido cafeíco, também exerce ação imunomoduladora em monócitos humanos sem apresentar efeito citotóxico (BÚFALO; SFORCIN, 2015).

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, 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 essas citocinas compõem as características da inflamação crônica de várias doenças (MISSIMA et al., 2010).

Alguns compostos de própolis verde, como o CAPE (éster feniletílico do ácido cafeíco) 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 ora, ou intraperitoneal (PAULINO et al., 2008). A atividade anti-inflamatória também foi observada por Machado et al. (2012), na inibição de citocinas próinflamatórias e aumento de citocinas inflamatórias, e possivelmente este efeito pode estar relacionado a presença desses compostos no extrato de própolis verde.

Silva et al. (2013), avaliando o efeito do tratamento *in vitro* e *in vivo* com extrato de própolis em macrófagos e infectados com *Leishmania brasiliensis*, mostraram a ação direta no parasita, como também na ativação celular. Esse mesmo efeito antiparasitário e imunomodulador foi observado em modelo experimental de infecção por *Trypanosoma cruzi*,

em que o extrato de própolis, além de reduzir a parasitemia, aumentou a sobrevivência dos animais sem induzir toxicidade (SALOMÃO et al., 2011).

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).

2.5.2 A ação da própolis verde em espécies de *Candida*

Própolis verde, produzida por *Apis mellífera*, apresenta em composição química flavonóides, terpenóides, fenilpropanóides e outros compostos. Flavonóides e compostos fenólicos são os principais componentes dessa própolis, que são responsáveis pela atividade antibacteriana e antifúngica (ROCHA et al., 2012; VOLPI; BERGONZINI, 2006).

Assim, a própolis foi estudada quanto à sua atividade antifúngica frente a 67 cepas de fungos, e os resultados demonstraram atividade fungistática para todas as cepas na concentração de 50 µg/mL e atividade fungicida na concentração de 200 µg/mL, para os microrganismos *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanea* (OLIVEIRA et al., 2006), mostrando o grande potencial antifúngico do produto. Nesse ínterim, a própolis emerge como um possível medicamento de origem nas espécies da biodiversidade brasileira com eficácia potencial e de baixo custo.

Estudos demonstraram também, que sensibilidade de *C. albicans* resistentes e presentes em pacientes aidéticos, reforçando o potencial do produto proposto, para o tratamento e controle das candidíases (AZEVEDO et al., 1999). Além dos estudos *in vitro* realizados, já foi demonstrado que a própolis é eficiente no tratamento de candidíase oral e que pode ser um medicamento contra infecções vaginais (ESPINEL-INGROFF et al., 2005).

Ota et al. (2001), avaliaram a atividade anti-*Candida* em pacientes com sintomas de estomatite (>400 UFC/mL de *Candida* na saliva) e empregaram o extrato alcoólico de própolis como enxaguatório bucal (solução a 6%). A análise da saliva dos pacientes tratados (2 vezes ao dia por duas semanas), demonstrou redução da carga fúngica, enquanto o grupo controle não demonstrou alteração no número de colônias encontradas.

Martins et al. (2002), avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis comercial no crescimento *in vitro* de *C. albicans* coletada de pacientes brasileiros HIV soro-positivos e soro-negativos com candidíase oral. Demonstrou-se, que o extrato de própolis inibiu o crescimento *in vitro* da *C. albicans* coletadas dos pacientes HIV soro-positivos, formando uma zona de inibição como a formada pelo medicamento referência, nistatina (anti-fúngico).

De Castro et al. (2010), avaliaram a atividade antifúngica frente a *C. albicans*, dos compostos: ácido caféico, p-cumárico, cinâmico e ácido ferúlico isolados, nas concentrações de 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, ou combinados entre si, nas dosagens de 100 µg/mL de cada um dos compostos, sendo que nenhum deles isolados ou combinados, demonstrou estar envolvido na atividade fungicida da própolis.

Recentemente, Berretta et al. (2013), desenvolveram géis mucoadesivos à base de extrato de própolis verde, para o tratamento de candidíase vulvovaginal, com 1% de própolis. Os resultados demonstraram que, para dois sistemas diferentes, um a base do polímero aniônico carbopol 940[®] e outro à base de co-polímero em bloco (poloxamer F127 – Lutrol F127[®]), os géis contendo própolis foram tão eficazes na redução da carga fúngica quanto um creme contendo clotrimazol (10mg/g), medicamento comumente utilizado para essa doença.

De Castro et al. (2013), avaliaram a eficácia de um gel mucoadesivo à base de extrato padronizado de própolis, nas concentrações de 1, 2 e 3%, tendo demonstrado uma tendência de maior eficácia com as concentrações mais altas de própolis, porém, todos foram semelhantes estatisticamente, assim como tão eficaz quanto o creme à base de clotrimazol (10mg/g).

Possamai et al. (2013), avaliaram tanto o efeito da própolis em microesferas de polietileno glicol (PGE), como o extrato bruto em fagócitos humanos infectados *Candida albicans*, demonstrando que o própolis estimula essas células frente ao fungo e este efeito é pontencializado na presença de PGE. Além disso, foi demonstrado que a própolis tem atividade antifúngica em modelo experimental de *C. albicans* modulando a resposta imune e permitindo o aumento da sobrevivência dos animais (YALFANI; KHOSRAVI; PIROUZ, 2013). Tal efeito pode estar relacionado à ação da própolis em inibir a formação de biofilme, devido a indução de morte celular via metacaspase e sinalização de RAS (CAPOCI et al., 2015; DE CASTRO et al., 2013; KHOSRAVI et al., 2014), sugerindo que a própolis pode ser utilizada como uma alternativa terapêutica para o controle de candidíase e candidemia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* em camundongos imunossuprimidos e infectados por *Candida albicans*.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do extrato de própolis sobre a disseminação fúngica;
- Verificar se o tratamento com extrato padronizado de própolis reverte a imunossupressão e interfere na migração e proliferação de leucócitos;
- Avaliar se o tratamento com extrato padronizado de própolis induz a ativação da imunidade inata nos camundongos imunossuprimidos;
- Investigar se o extrato de própolis interfere no perfil inflamatório sistêmico observado na candidemia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos C57Bl/6, fêmeas, com 8 a 12 semanas de idade e peso médio de 21 g, foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas na área de Ciência em animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Durante o estudo, os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas no biotério de experimentação do Laboratório de Imunofisiologia. Tanto a água como a ração foram oferecidas *ad libitum*.

A pesquisa foi conduzida de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e o presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão- UFMA (Protocolo N°- 23115.003819/2016-11) (Anexo 1).

4.2 Preparação do Extrato Padronizado de própolis de *Apis mellifera*

O extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (P), foi produzido a partir de uma mistura composta por matéria prima de própolis obtida das regiões Sul e Sudeste do Brasil, majoritariamente, de própolis verde, de acordo com Berreta (2005).

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.

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. Este pó foi submetido a técnicas extrativas utilizando-se 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).

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).

4.3 Manutenção de *Candida albicans*

C. albicans (ATCC 10231), foram mantidas em caldo Sabouraud, a 37° C, por 18 h, após esse período, as culturas foram lavadas, contadas e diluídas em PBS estéril. *In vivo*, leveduras de *C. albicans* foram mantidas em meio líquido YPD em fase estacionária de crescimento por 16 horas a 30°C (BERRETTA et al., 2013; FATAHINIA; KHOSRAVI; SHOKRI, 2012).

4.4 Avaliação da sobrevivência dos animais

Os animais foram imunossuprimidos com dexametasona, 3mg/kg (Genéricos Hipolabor) pela via intraperitoneal, diariamente, durante uma semana (LALLO; JOSÉ; BONDAN, 2002). Ao final, os animais imunossuprimidos receberam o inóculo fúngico de *Candida albicans* (2×10^6 inóculo) em volume de 200 µL de PBS (NINOMIYA et al., 2005).

Após 24 horas da infecção, os animais foram randomicamente separados em 3 grupos: Controle (PBS), P10 (extrato de própolis na dose de 10 mg/kg) e P100 (extrato de própolis na dose de 100 mg/kg). Os tratamentos foram feitos intraperitonealmente durante 15 dias. A imunossupressão foi mantida por mais 15 dias após o inóculo.

Para a análise da sobrevivência, os animais (n = 5) foram observados durante 15 dias após a infecção, 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):

$$ILS (\%) = \frac{(\text{MST do grupo tratado} - \text{MST do grupo controle}) \times 100}{\text{MST do grupo controle}}$$

4.5 Avaliação de Parâmetros Imunofisiológicos

Após a obtenção dos dados da sobrevivência, foi selecionada a dose de 100mg/kg para as demais análises. Os animais foram imunossuprimidos 7 dias, infectados no oitavo dia e o tratamento no nono dia. A análise imunológica e contagem das unidades formadoras de

colônia no lavado peritoneal e no baço, foram realizadas no décimo dia, utilizando-se a associação de cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de quetamina (25 mg/kg) para eutanisar os animais (RIOS; ABREU; FILHO, 2017).

4.5.1 Avaliação de Parâmetros Hematológicos

O sangue dos camundongos (100 μ L) foi obtido pelo plexo orbital com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), foi avaliado em analisador hematológico automatizado (Poch -100iV Diff, Sysmex Corp), considerando os parâmetros descritos por Machado et al. (2012). Para análise do perfil celular no sangue periférico, uma alíquota da amostra do sangue foi retirada pelo plexo orbital, para obtenção do esfregaço sanguíneo, em lâmina de vidro, corado com o *kit Instant-Prov* (Newprov, Pinhais, Brazil) (MACIEL et al., 2008). A contagem das células foi realizada com auxílio em microscópio óptico de luz comum.

4.5.2 Quantificação de células peritoneais e de células dos órgãos linfoides

Células da cavidade peritoneal foram coletadas a partir da lavagem da cavidade com 5 mL de PBS estéril e gelado, seguido de massagem no peritônio.

As células do baço, da medula óssea e do linfonodo mesentérico (MACHADO et al., 2012), foram coradas com cristal violeta (0,05% em ácido acético 30%), para determinação do número total de células. A contagem diferencial foi determinada por preparações de cytospin coradas com *Instant-Prov* (Newprov, Pinhais, Brasil) (NASCIMENTO et al., 2015).

4.5.3 Quantificação das unidades formadoras de colônias fúngicas (CFU)

Os exsudatos obtidos na cavidade peritoneal e nas suspensões de baço, foram diluídos serialmente na razão de 10X (1:10, 1:100, 1:1000), em placa de 96 poços. Em seguida, alíquotas de 10 μ L dessas diluições foram semeadas em placas de Petri, em meio de cultura YPD, a semeadura por esgotamento do inóculo foi realizada com alça bacteriológica, mantendo-se as placas a 37°C, por 24 h, para a realização da contagem de colônias fúngicas viáveis (QUINTIN et al., 2014).

4.5.4 Determinação da produção *ex-vivo* de óxido nítrico (NO)

Células peritoneais (2×10^6 /mL, foram cultivadas em 100 μ L de meio RPMI 1640 completo

[10 mM HEPES, 11 mM de bicarbonato de sódio, 100 U / mL de penicilina, 100 mg / mL de estreptomicina] e estimuladas com blastóporos de *Candida albicans* (proporção 2:1), durante 48 h, a 37° C, em atmosfera úmida.

Após a incubação, o sobrenadante foi recolhido e incubado em volume igual (50 µL) com reagente de Griess (1% de sulfanilamida / 0,1% de naftalenodiamina / 2,5% de H₃PO₄), durante 10 min, à temperatura ambiente. Para quantificar a acumulação de nitrito. A absorbância foi determinada a 550 nm. A conversão da absorbância em µM 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).

4.5.5 Quantificação de citocinas pelo método de CBA (*Cytometric bead arrays*)

A presença das citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17), no soro de animais foi quantificada, utilizando-se *kit* CBA Th1/Th2 em uma mesma amostra. Três populações de *beads*, com distintas intensidades de fluorescência, detectadas em FL3, e conjugadas a anticorpos de captura específicos para cada citocina, foram incubadas com alíquotas de soro ou do padrão e em presença de anticorpos de detecção conjugados com Ficoeritrina (PE), detectados em FL2. Para o ensaio, foram adicionados a 50 µL dos soros individuais, 50 µL da mistura de *beads* e 50 µL do reagente de detecção Th1/Th2/Th17 PE (Mouse Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent/1 vial, 4 mL). O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogenizados e incubados por duas horas, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, conforme orientações do fabricante. Os resultados foram adquiridos por citometria de fluxo com FACScalibur (BD) e analisados utilizando-se o *software CellQuest* (BD).

4.5.6 Ensaio de imunofenotipagem

Para determinação do fenótipo dos esplenócitos foram usados anticorpos monoclonais comerciais contra os seguintes marcadores: CD3 (FITC), CD4 (PerCP) e CD28 (PE); CD3 (FITC), CD4 (PerCP) e CD62L (PE), todos adquiridos da BD Biosciences Pharmingen. As células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACScalibur) e os dados obtidos foram analisados usando-se o “software” *FlowJo* (BD).

4.6 Avaliação da ativação de macrófagos *in vitro*

4.6.1 Isolamento e cultura de macrófagos

Os macrófagos peritoneais foram colhidos a partir da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6, por lavagem com PBS 4 dias após a injeção de 2 mL de tioglicolato a 3% (SEREZANI et al., 2006).

4.6.2 Ensaio de fagocitose

A capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais foi avaliada usando ^{FITC} *C. albicans* (MORATO-MARQUES et al., 2011). Macrófagos peritoneais (2×10^6 /mL) foram cultivados em sextuplicata em placas de cultura de 96 poços em presença ou ausência de dexametasona (4 μ g/mL), durante 48 horas, com modificações (SÁNCHEZ-REYES et al., 2014). Em seguida, as células foram tratadas com extrato padronizado de própolis (100 μ g/mL), durante 12 horas, e infectadas com *heat-killed C. albicans*, na razão de 2: 1. Após uma hora da infecção, foi avaliada a fagocitose.

Adicionou-se azul de *Trypan* (250 μ g/mL), durante 10 min, para extinguir a fluorescência da levedura extracelular. A fluorescência intracelular foi determinada, utilizando-se uma excitação de Spectramax Gemini EM 485 excitação/535 emissão (Molecular Devices). O índice fagocítico foi calculado em unidades de fluorescência relativa (ARONOFF; CANETTI; PETERS-GOLDEN, 2004).

4.6.3 Extração de RNA e PCR semiquantitativo

A partir da cultura celular, O RNA foi isolado utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e PCR foi realizada conforme descrito anteriormente (MORATO-MARQUES et al., 2011). Os mRNA de Dectina-1 (*Clec7A*) e Receptor de Manose (MR) adquiridos da BioVision foram normalizados para β -actina e o respectivo controle foi ajustado para 100%. A unidade de fluorescência relativa (RFU), foi traçada em função do tempo e as curvas de decaimento foram calculadas.

4.6.4 Western Blotting

Macrófagos peritoneais (5×10^6 /mL), tratados com dexametasona ($4 \mu\text{g/mL}$), foram plaqueados em placas de cultura 6 poços estimulado, ou não com extrato padronizado de própolis ($100 \mu\text{g/mL}$), durante 12 horas, seguido da infecção por *C. albicans* (2:1) por 1 hora. As células foram mortas com tampão de lise (50 mM Tris-HCL (pH 7.4), 25 μM KCl, 5 mM MgCl_2 , e 0.2 % NP-40), suplementado com inibidores de proteases (Roche Diagnostics).

A análise por *immunoblotting* foi realizada como descrito por Kim e Sudbery (2011), utilizando anticorpos primários para Dectina-1 (1:1000; Biovision), receptor de Manose (1:1000, Abcam) e β actina (1:10,000, Sigma, Aldrich). A intensidade da banda relativa foi quantificada, utilizando o *software ImageJ* 526 (NIH, Bethesda, MD, EUA), como anteriormente descrito por Serezani et al. (2011).

4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (S.D.). Para avaliação da curva de sobrevida foi utilizada a curva de Kaplan-Meier e a análise estatística foi realizada pelo teste de Log-Rank. Para determinar se a variabilidade das amostras seguia um padrão de distribuição normal foi aplicado o teste de D' Agostino-Pearson.

A diferença entre os demais resultados detectados durante os experimentos foi submetida à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *t Student*, com auxílio do *software Graph Pad Prism*, versão 5.0. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Aumento da sobrevivência de camundongos imunossuprimidos e infectados com *C.albicans* tratados com extrato de própolis

O grupo P100 apresentou 100% de sobrevivência aos animais infectados por *C. albicans* (Figura 9). O mesmo resultado não se repetiu no grupo P10, entretanto, houve um aumento da expectativa de vida em 167% neste grupo, quando comparado ao grupo controle (Tabela 1).

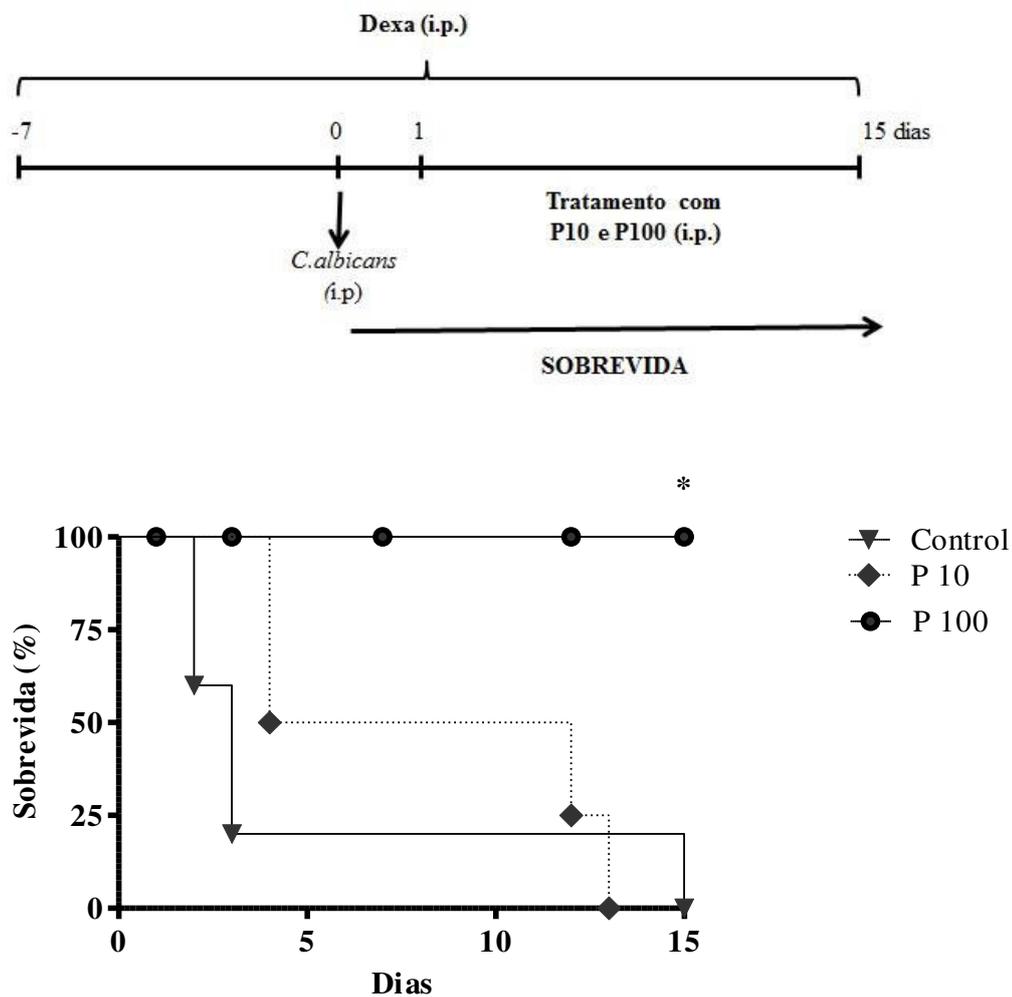


Figura 9. Extrato de própolis aumenta a sobrevivência de camundongos imunossuprimidos com dexametasona e infectados com *Candida albicans* Animais C57Bl/6 foram imunossuprimidos com dexametasona (3 mg/kg) durante uma semana e, em seguida, infectados com *C.albicans* (2×10^6) e tratados a partir de 24 horas após a infecção, com 10 (P10) ou 100 mg/kg (P100) do extrato de própolis. A imunossupressão e o tratamento com extrato de própolis foram mantidas por quinze dias após a infecção. Os resultados na curva de Kaplan Meyer, corresponde à média \pm s.d. de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ em comparação com o controle.

Tabela 1. Sobrevida de animais infectados com *Candida albicans* e tratados, após a infecção, com extrato de própolis (P10 e P100) durante quinze dias

Tratamento	MST (DIAS) ^a	ILS (%)
Controle	3	-
P 10	8	167
P 100	-	-

^aMST median survival time; ^bILS: increase life-span

5.2 Efeito do tratamento com extrato de própolis nos parâmetros hematológicos de animais infectados *C.albicans*

Não foram observadas alterações na avaliação dos parâmetros hematológicos, exceto quanto ao número aumentado de leucócitos (Tabela 2). O aumento de leucócitos foi observado tanto no exame hematológico como na avaliação do esfregaço sanguíneo, sendo observado o aumento tanto de células mononucleares (linfócitos e monócitos), quanto de polimorfonucleares, nos animais tratados com a maior concentração do extrato de própolis (Tabela 3).

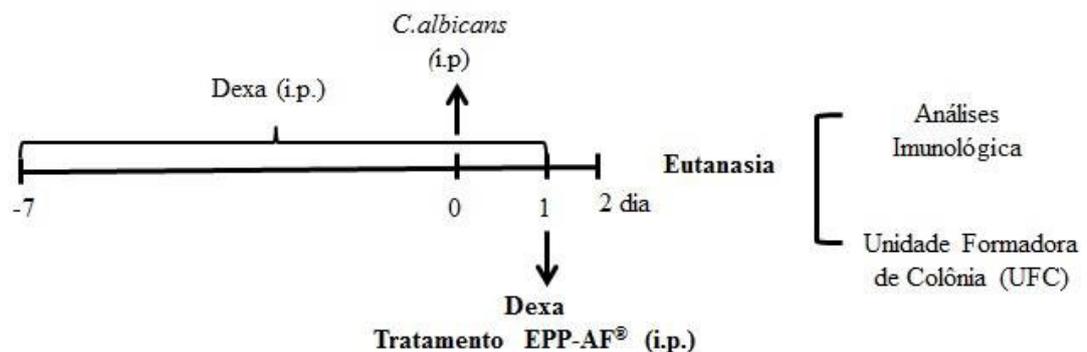


Tabela 2. Efeito do tratamento intraperitoneal com extrato de própolis nos parâmetros hematológicos de camundongos C57Bl/6, infectados com *C.albicans*

Grupos	Não infectados			Infectados	
	Controle Limpo	Controle Dexa	P100 Dexa	Controle Dexa	P100 Dexa
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	6,2 ± 0,8	2,7 ± 0,5#	5,2 ± 0,6*	5,2 ± 1,3	5,9 ± 1,8#
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	9,5 ± 0,8	10,0 ± 0,4	10,3 ± 0,3	9,8 ± 0,4	9,7 ± 0,2
HGB (g/dL)	13,2 ± 1,0	13,8 ± 0,7	14,07 ± 0,4	13,3 ± 0,5	13,3 ± 0,4
HCT (%)	46,8 ± 4,4	48,7 ± 2,1	50,2 ± 1,2	47,6 ± 2,06	47,4 ± 1
MCV (fL)	49,0 ± 0,2	48,6 ± 0,4	48,5 ± 0,5	48,3 ± 0,4	48,5 ± 0,4
MCH (pg)	13,8 ± 0,1	13,7 ± 0,2	13,6 ± 0,1	13,4 ± 0,1	13,7 ± 0,2
MCHC(g/dL)	28,2 ± 0,4	28,4 ± 0,2	28,01 ± 0,2	27,9 ± 0,3	28,1 ± 0,4
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	1280,6±139	1378,7±86,0	1096,3±554,0	1516,6±95,5	1400,3± 149,4
RDW-SD (fL)	24,6 ± 1,1	24,6 ± 0,6	24,9 ± 0,2	25,08 ± 0,7	25,5 ± 1,0
RDW-CV (%)	13,4 ± 0,4	14,06 ± 0,5	14,2 ± 0,4	14,3 ± 0,4	14,2 ± 0,3

Os dados do grupo controle foram utilizados como valores de referência e estão representados com média ± desvio padrão. WBC: leucócitos, RBC: Eritrócitos, HGB: hemácias, HCT: hematócritos, MCV: volume corpuscular médio, MCH: hemoglobina, MCHC: concentração média de hemoglobina corpuscular, PLT: plaquetas, RDW-CV: largura de distribuição dos eritrócitos. * p <0,05 quando comparado com o grupo Controle imunossuprimido com dexametasona (Control Dexa). # p<0,05 em relação ao grupo Limpo. Analisados pelo teste ANOVA *one-way* seguido de pós teste Kruskal- Wallis.

Tabela 3. Contagem diferencial sanguínea de camundongos imunossuprimidos (controle) e animais com *Candida* (infectados) tratados pela via intraperitoneal P 100

Grupos	Não infectados			Infectados	
	Controle Limpo	Controle Dexa	P100 Dexa	Controle Dexa	P100 Dexa
Monócitos	0,2±0,1	0,1±0,1	0,3±0,1*	0,1±0,1	0,1±0,1
Neutrófilos	0,6±0,1	0,8±0,1	2,7±0,4*	2,5±0,5	3,4±0,4*
Linfócitos	5,4±0,2	1,8±0,1	2,3±0,3*	2,6±0,5	2,3±0,4

Os dados estão representados com média ± desvio padrão. * P <0,05 quando comparado com o grupo controle. Analisados pelo teste ANOVA *one-way* seguido de pós teste Kruskal- Wallis.

5.3 O tratamento com própolis reduziu o número de unidades formadoras de colônia (CFU) de *C. albicans* no lavado peritoneal e no baço

O tratamento com própolis reduziu o número de unidades formadoras de colônias tanto no lavado peritoneal (Figura 10A) como no baço (Figura 10B).

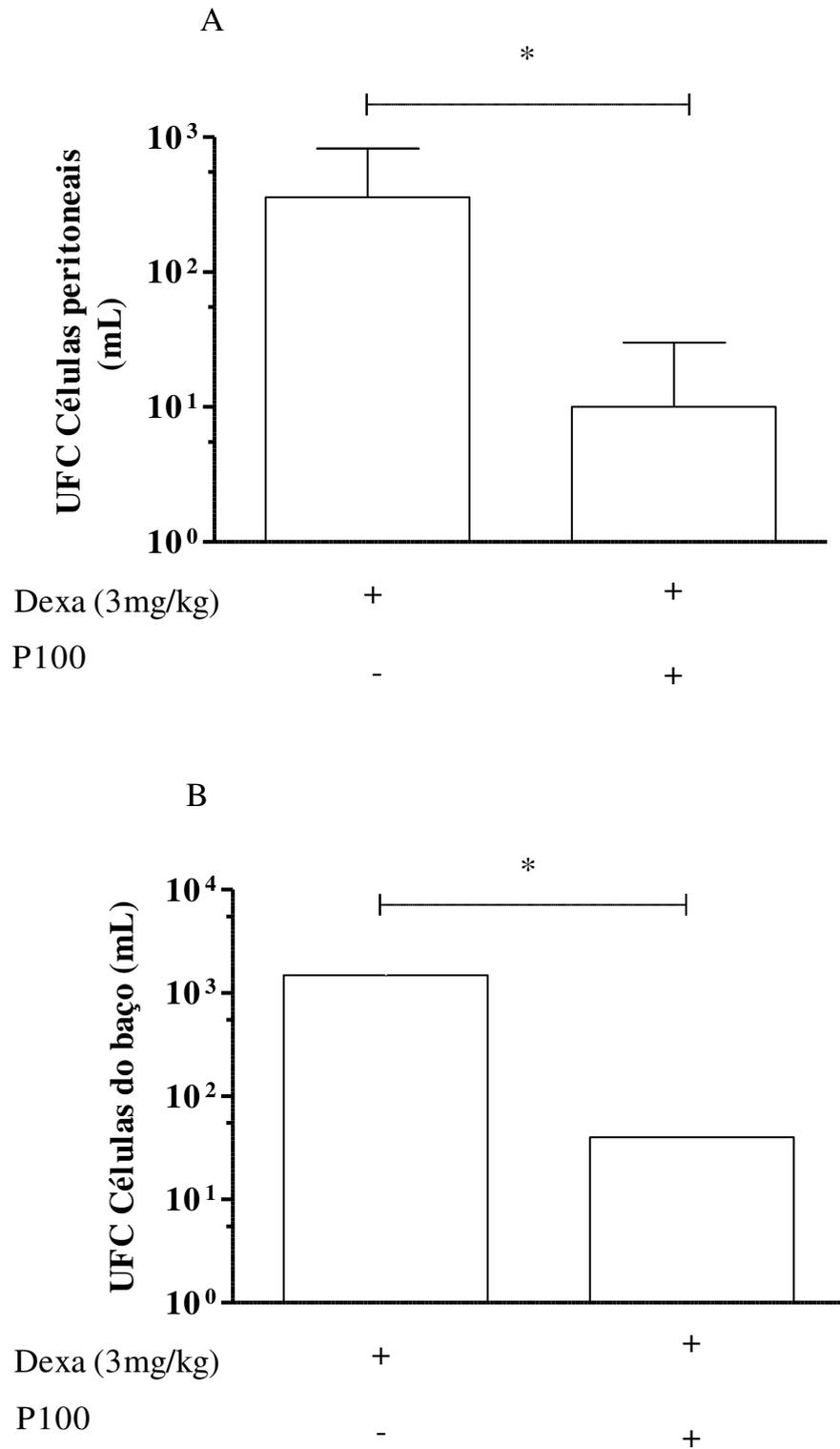


Figura 10. O tratamento com extrato de própolis diminuiu o número de unidades formadoras de colônias no peritônio e no baço de animais imunossuprimidos infectados com *C. albicans*. Camundongos receberam inóculo de *C. albicans* (2×10^6) e 24 horas mais tarde, foram tratados com dose única de P100 (100 mg/Kg). As contagens das colônias foram realizadas 48 horas após a infecção. Os resultados foram expressos como médias \pm S.D. de 7 animais / grupo. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo de controle.

5.4 Extrato de própolis aumenta o recrutamento de leucócitos em animais infectados com *Candida albicans*

O tratamento com própolis apresentou aumento do número total de células na cavidade peritoneal, incluindo tanto polimorfonucleares quanto linfócitos, mas mantendo inalterado o número de macrófagos (Tabela 4).

O grupo P100 também apresentou alterações no número de células baço, entretanto, esse mesmo efeito não foi observado na medula óssea (Tabela 5).

Tabela 4. Efeito do tratamento intraperitoneal com extrato de própolis na contagem total e diferencial das células peritoneais em camundongos imunossuprimidos infectados com *C. albicans*

Células (10 ⁶ /mL)	Grupos	
	Controle	P100
Total	1,7±0,9	2,3±0,5*
Macrófagos	1,2±0,1	1,2±0,2
Neutrófilos	0,1 ±0, 1	0,2±0,2*
Linfócitos	0,5±0,1	1±0,4*

Os dados representam media ± S.D. **p* <0.05 quando comparados ao grupo controle. Analisado pelo *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5. Efeito do tratamento intraperitoneal com extrato de própolis na contagem total das células do baço e medula óssea em camundongos imunossuprimidos infectados com *C.albicans*

Céulas (10 ⁶ /mL)	Grupos	
	Controle	P100
Baço	10,7±3,1	19,5±9,0*
Medula óssea	5,2±1,6	5,9±3,5

Os dados representam a media ± S.D. (*) *p* <0.05 quando comparado ao grupo controle. Analisado pelo *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.

5.5 Efeito do extrato de própolis distribuição de linfócitos em animais infectados por *C.albicans*

O tratamento com extrato de própolis aumentou o número de linfócitos auxiliares (CD3⁺CD4⁺), mas não alterou o número de células ativadas, expressando CD28 e CD62L (Figura 11).

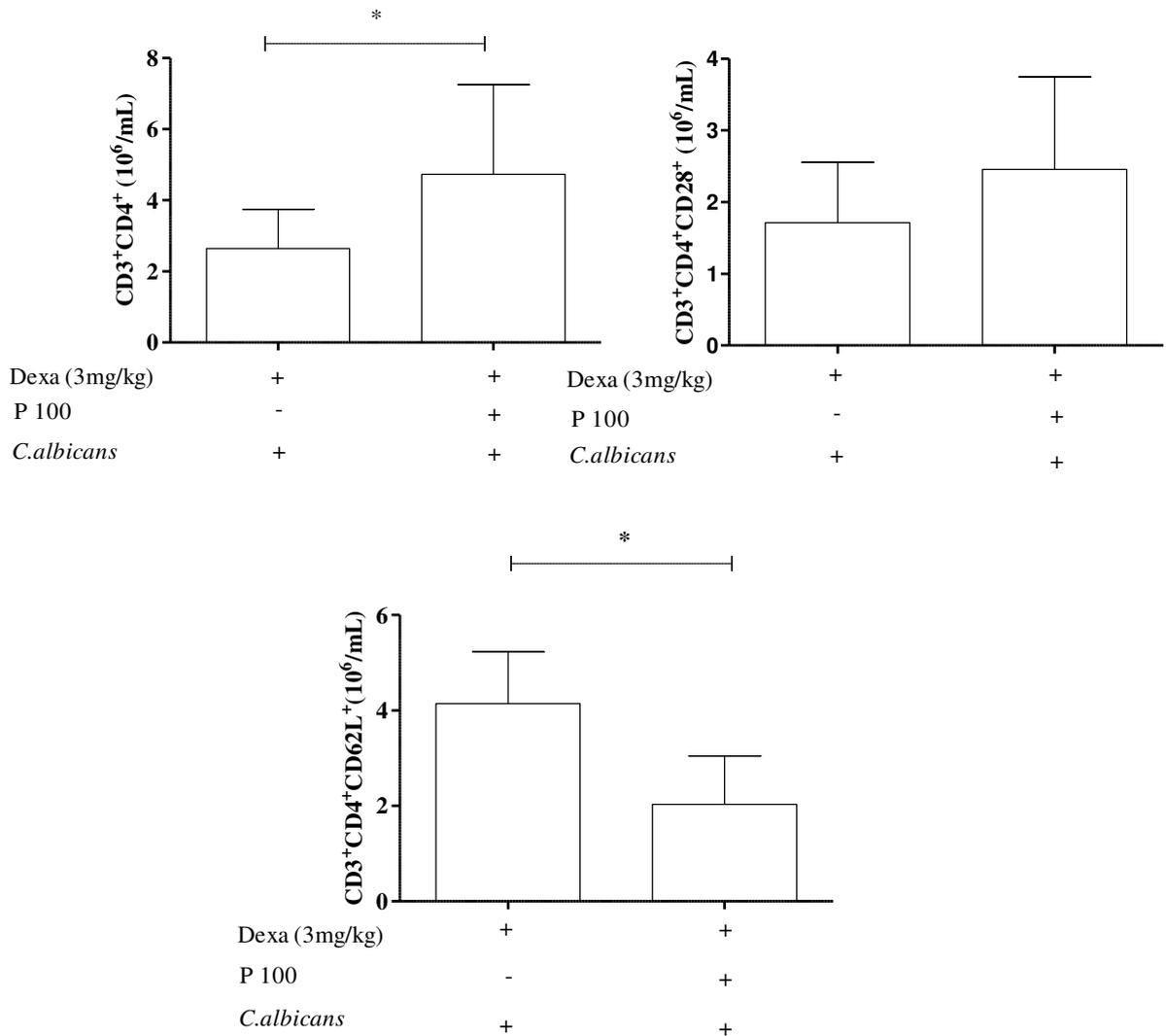


Figura 11. Efeito do extrato de própolis em linfócitos T auxiliares de animais imunossuprimidos e infectados com *C. albicans*. Valores absolutos de linfócitos T auxiliares (CD3⁺ CD4⁺) e dos marcadores de ativação celular (CD28 e CD62L) no baço. Os resultados foram expressos como médias \pm S.D. Os valores absolutos foram calculados indiretamente, a partir da contagem total de células peritoneais e da porcentagem para cada uma das subpopulações. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo de controle.

5.6 Produção *ex-vivo* de óxido nítrico em células peritoneais

O grupo P100 apresentou aumento na produção de óxido nítrico (NO), nas culturas de células peritoneais estimuladas com blastóporo de *Candida* (Figura 12).

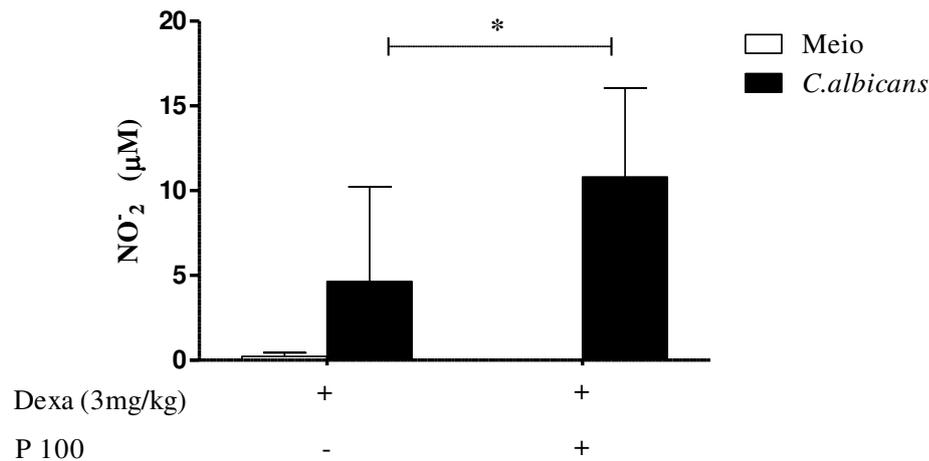


Figura 12. Extrato de própolis aumenta a produção de óxido nítrico na cultura de células peritoneais de animais imunossuprimidos e infectados com *C. albicans*. Camundongos C57Bl/6 foram tratados intraperitonealmente (ip.) com extrato de própolis 100 (mg / mL), após 24 horas de infecção com *C. albicans*. Células peritoneais (2×10^6 / mL), foram colhidas 48 horas após a infecção e estimuladas com blastóporo de *C. albicans* (razão de 2: 1). Após 48 horas de cultura, o sobrenadante foi colhido para quantificação do óxido nítrico (NO). Os dados representam a média \pm S.D da concentração de NO em triplicata / animal (n = 7). * $p < 0,05$, em comparação com o grupo de controle estimulado.

5.7 Efeito do extrato de própolis na produção de citocinas no soro de camundongos imunossuprimidos e infectados com *C. albicans*

Considerando que o extrato de própolis induziu aumento da celularidade sistêmica, bem como inibiu o crescimento de unidades formadoras de *Candida*, foram quantificadas as citocinas inflamatórias séricas. Como ilustrado na Tabela 4, a concentração de IL-, como de TNF- α do grupo P100 diminuiu em relação ao grupo controle (Tabela 4). As citocinas IL-4, IL-2, IL-10, IFN- γ e IL-17 não foram detectadas (dados não mostrados).

Tabela 6. Efeito do tratamento do extrato de própolis na produção de citocinas no soro de animais infectados com *C. albicans*

Citocinas (pg/mL)	Grupos	
	Controle Dexa	P 100 Dexa
IL-6	12,0 \pm 4,9	4, 5 \pm 2,9*
TNF- α	3,3 \pm 1,1	1,7 \pm 1,2*

Os dados são representados pela média \pm S.D. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. Analisado pelo *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis.

5.8 Extrato de Própolis induz aumento de fagocitose

Considerando que o P100 aumentou a sobrevivência, reduziu as unidades formadoras de colônia e aumentou o NO, investigou-se se ele poderia estar aumentando a fagocitose. Para testar esta hipótese, macrófagos de cavidade peritoneal foram incubadas com extrato de própolis durante 12 horas, e infectadas com *C. albicans* durante 1 hora. Os resultados demonstram que, o extrato de própolis induz aumento da fagocitose pelas células imunossuprimidas com dexametasona, sugerindo uma reversão da atividade inibitória da dexametasona (Figura 13).

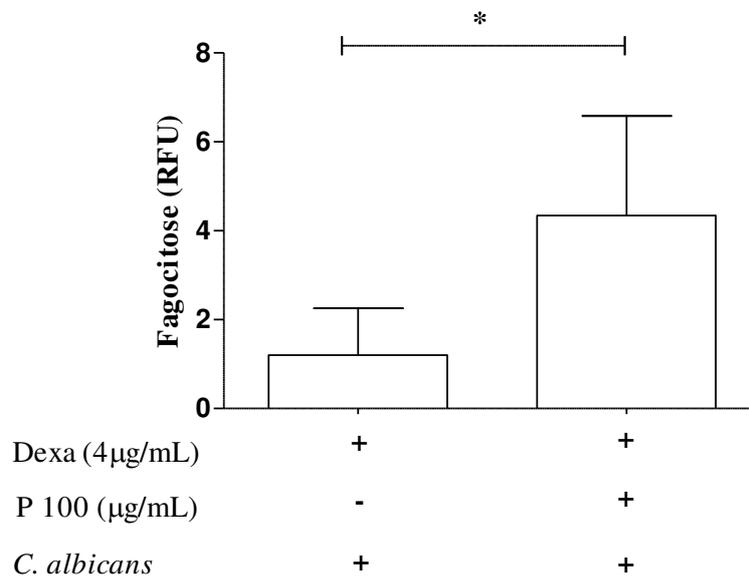
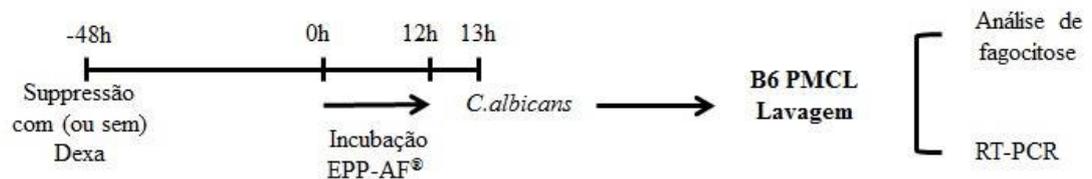


Figura 13. Aumento da fagocitose em macrófagos incubados com extrato de própolis e infectados com *C. albicans*. Após a supressão, macrófagos peritoneais foram incubados com extrato de própolis (100 µg / mL) por 12 horas. Em seguida, *head-killed*^{FITC} *C. albicans* foi adicionado na proporção de 2:1. Após 1 hora de cocultura, o ensaio de fagocitose foi realizado. Os dados representam a média ± S.D de um experimento individual realizado em nove repetições. * $p < 0,05$ versus controle por ANOVA.

5.9 Extrato de própolis não induz aumento de expressão de Dectina-1 e Receptor de Manose

Em seguida, foi investigado o efeito do extrato de própolis na expressão proteica de receptores de dectina-1 e receptor de manose, em macrófagos. O extrato de própolis não induz aumento da transcrição gênica, bem como a expressão proteica para receptores de Dectina-1 e Manose quando comparado a células suprimidas com dexametasona (Figura 14).

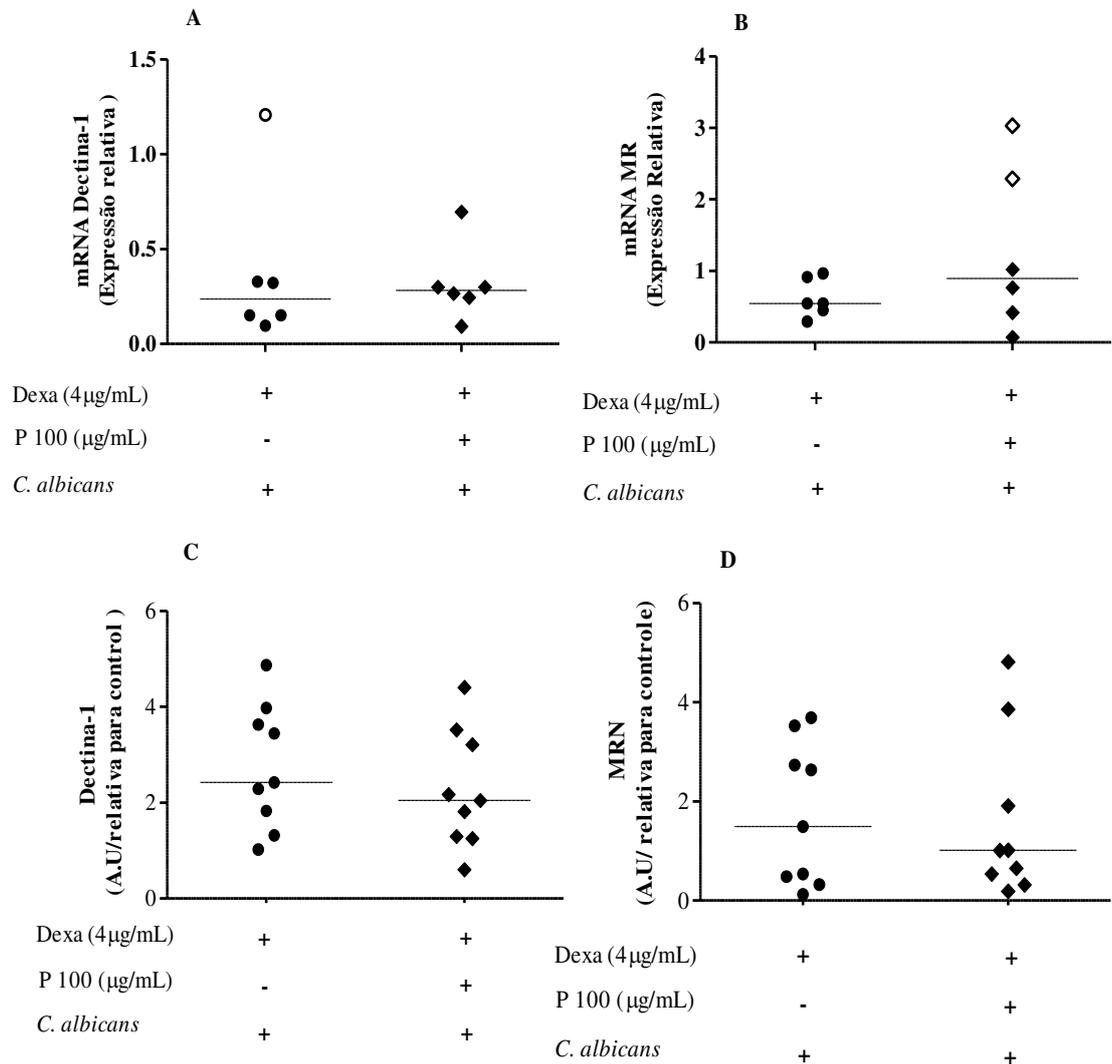


Figura 14. Extrato de própolis não induz a expressão protéica de Dectina-1 e Receptor de Manose em macrófagos. Análise de Dectina-1 e Receptor de Manose em sobrenadantes da linha celular de macrófagos peritoneais B6 (2×10^6 / mL) cultivados suprimidos (ou não) com dexametasona (4 µg / mL) e incubados extrato de própolis (100 µg / mL) durante 12 horas e desafiados com *C. albicans* (proporção 2: 1) durante 1 hora. A expressão de mRNA de receptor de Dectina-1 e Manose (A, B) foi determinada por PCR em tempo real e expressão de proteína em unidade arbitrária por imunotransferência (C, D). Os gráficos representam um experimento e são apresentados como média \pm S.D normalizada para a média de controle de cada realizado em sextuplicado por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o controle por ANOVA. A actina é utilizada como controle de carga. Em A e B os pontos representados por (○) e (◇) foram considerados *outlier* (Teste de Grubb's $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que o extrato de própolis controlou a infecção disseminada ocasionada por *Candida albicans* em animais imunossuprimidos, além de aumentar a expectativa de vida dos animais com sepse por *Candida*. Pode-se inferir que, o aumento da sobrevida observado pode estar relacionado a três fatores principais: ação fungicida do extrato; recrutamento e ativação de fagócitos no foco da infecção e, modulação da resposta inflamatória sistêmica.

O aumento da sobrevida de animais com infecção por *C. albicans* observado neste trabalho, corrobora com Yalfani, Khosravi e Pirouz (2013), que mostraram que a taxa de mortalidade tornou-se relativamente baixa em animais portadores de tumor e infectados com *C.albicans*, quando tratados com própolis. Essa ação possivelmente, está associada ao efeito antifúngico do tratamento, uma vez que foi utilizada a mesma via de indução da infecção. Segundo De Castro et al. (2013), a própolis tem efeito direto tanto na morfogênese quanto na virulência de *Candida albicans*. Os autores demonstraram que a própolis inibe os três tipos morfológicos do fungo, induzindo a morte celular via metacaspase e sinalização de RAS, reduzindo a formação de unidades formadoras de colônia, em especial a formação de biofilme. Estes mesmos resultados foram obtidos em amostras de pacientes com vulvovaginite, ou com infecção oral decorrente de estomatite dentária (CAPISTRANO et al., 2013; CAPOCI et al., 2015).

O ácido cinâmico, composto presente nessa própolis, parece ter relação direta com a ação fungicida observada, visto ter a capacidade de inibir a filamentação e o dimorfismo de *Candida albicans* por alterar a hidrofobicidade da superfície celular fúngica, bem como a síntese de 1,3- β -glucano, induzindo a sinalização pelos PAMPs, que interagem com receptores específicos na superfície de fagócitos (ARIF et al., 2009; DE CASTRO et al., 2013; DE VITA et al., 2016; GUZMAN, 2014). Além dessa atividade fungicida, em trabalhos anteriores, já foi demonstrado que a própolis apresenta ação sobre os mecanismos imunológicos anti-*Candida* (BÚFALO et al., 2014; KHOSRAVI et al., 2014; TOBALDINI-VALERIO et al., 2016).

Neste trabalho, a própolis induziu um aumento de neutrófilos sanguíneos e peritoneais total e no foco da infecção, demonstrando ter a capacidade de reverter a imunossupressão, favorecendo o controle da infecção. Resultados semelhantes foram observados por Dimov et al. (1991), visto que ao utilizarem a própolis no tratamento oral, demonstraram a capacidade de reverter e modular a resposta imune durante a infecção por *C. albicans* em animais

imunossuprimidos com ciclofosfamida. Além disso, Hori et al. (2013), demonstraram que EPP-AF[®] estimula macrófagos peritoneais na ativação de inflamassoma NLRP3, o que permite a ativação de outra via da resposta inata.

A capacidade imunomoduladora da própolis é reforçada pelo aumento no número de células no baço e maior número de linfócitos T CD4⁺. Resultados semelhantes foram descritos por Gao et al. (2014), ao mostrarem que o tratamento de camundongos idosos, com diferentes concentrações de própolis verde, durante 4 semanas aumentou tanto a fagocitose como o número de linfócitos esplênicos. Como o ácido cinâmico, além da ação fungicida, apresenta também efeito sobre a ativação de linfócitos tímicos e esplênicos, durante a infecção por *Klebsiella pneumoniae* (IVANOVSKA et al., 1995), é razoável supor que, os efeitos observados nesta pesquisa, possam estar, pelo menos, em grande parte, associados à presença desse composto no extrato. Adicionalmente, Conti et al. (2013) demonstraram, em ensaios *in vitro*, que esse ácido está envolvido nos mecanismos efetores para a produção de NO e de outras espécies reativas de oxigênio.

Sabendo que a resposta do hospedeiro para *C. albicans*, inclui o recrutamento de fagócitos, seguindo da ativação da sinalização intracelular, geração de radicais livres e estímulo de mediadores inflamatórios (BYRD et al., 2013; GOW; HUBE, 2012), passamos a investigar a participação dessas células no resultado observado. Observou-se aumento da produção de óxido nítrico por células peritoneais no grupo tratado com própolis quando desafiados *ex vivo* com *C. albicans*, em mecanismo provavelmente, relacionado a presença do ácido cinâmico. Conti et al. (2013) demonstraram *in vitro* que este ácido está envolvido nos mecanismos efetores como a produção de NO e de outras espécies reativas de oxigênio produzidas por monócitos humanos.

A reatividade do óxido nítrico e seus estados múltiplos de redox podem causar inativação em uma variedade de enzimas celulares, podendo interromper a respiração, como também interagir com o DNA após a penetração nos núcleos de microrganismos, resultando em desaminação, inibição da síntese de RNAm e interferência na síntese de proteínas (AHMADI et al., 2016; DE GROOTE; FANG, 1995; TAMIR et al., 1996). No caso de *Candida albicans*, o NO induz uma baixa regulação do gene *YHB1*, a principal proteína relacionada a desintoxicação de ROS e que está relacionada ao fator de virulência em modelo experimental de candidíase sistêmica (HROMATKA; NOBLE; JOHNSON, 2005).

Visto que a própolis ativou componentes da resposta imune inata na infecção disseminada proporcionando o aumento da sobrevivência, avaliou-se o efeito do extrato de própolis na expressão dos PRRs, em macrófagos peritoneais. O tratamento com o extrato

padronizado aumentou a fagocitose em macrófagos peritoneais, suprimidos com dexametasona e infectados com *C. albicans*. Entretanto, não se observou o mesmo efeito do extrato quando avaliou-se a sinalização de receptores inatos *in vitro*. Embora dectina-1 e o receptor de manose sejam expressos em monócitos e macrófagos e tenham reconhecida importância na indução da resposta imune, existem outros receptores de reconhecimento padrão envolvidos e que contribuem para a resposta antifúngica (NETEA et al., 2015).

O tratamento de extrato padronizado de própolis em animais imunossuprimidos e infectados com *Candida* reduziu a produção de citocinas IL-6 e TNF- α , demonstrando que a própolis teve efeito anti-inflamatório, controlando a inflamação causada pela infecção fúngica tanto no foco da infecção como sistemicamente, o que pode ter relação com o aumento na sobrevivência dos animais.

As infecções disseminadas por *Candida* são normalmente, acompanhadas pelo aumento na produção de inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12, entre outras, e essas citocinas também estão envolvidas nos quadros graves associadas à sepse, sepse grave ou choque séptico (DUGGAN et al., 2015; PATIL; BOHANNON; SHERWOOD, 2016). Considerando que, o tratamento com própolis inibiu a produção de IL-6, e TNF- α , pode-se propor que a ação da própolis por atuar na regulação de citocinas inflamatórias, aumentou a sobrevivência dos animais com sepse por *C. albicans*.

O efeito anti-inflamatório da própolis já foi descrito por Machado et al. (2012), ao observarem que o tratamento com a própolis inibiu a secreção de citocinas proinflamatórias e aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias em modelos de inflamação agudo como crônico. Corroboram com esses achados, os resultados de outros autores, mostrando a ação anti-inflamatória da própolis (HU et al., 2005; PAULINO et al., 2008; TAN-NO et al., 2006; XUAN et al., 2011)

Segundo Bachiega et al. (2012), ocorre aumento na produção de IL-1 β , e redução de IL-6 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e tratados com a própolis verde ou com os compostos isolados, como o ácido p-cumárico e cinâmico, sugerindo que os compostos podem estar associados à modulação da resposta inflamatória, como observado neste estudo. Assim, o presente estudo mostra que, em modelo de imunossupressão e infecção de *Candida albicans*, o extrato padronizado de própolis é uma importante alternativa terapêutica, por estimular a regulação do sistema imune, mesmo sob a ação imunossupressora da dexametasona. Outro aspecto promissor do extrato padronizado de própolis é seu efeito anti-inflamatório, com repercussão local e sistêmica, por participar de várias interações que, além

de controlar a infecção, modulam o processo inflamatório e aumentam a sobrevivência dos animais.

7 CONCLUSÕES

- O tratamento com extrato padronizado de própolis na dose de 100 mg/kg aumentou a sobrevivência dos animais imunossuprimidos e com candidemia inibindo a disseminação fúngica;
- O extrato padronizado de própolis reverte a imunossupressão ocasionada por dexametasona, por meio da proliferação leucocitária global bem como no foco da infecção em animais com candidíase disseminada;
- O tratamento com extrato padronizado de própolis ativou células fagocíticas
- O extrato de padronizado de própolis tem efeito anti-inflamatório sistêmica em candidemia experimental.

REFERÊNCIAS

AHMADI, M. et al. Sustained nitric oxide releasing nanoparticles induce cell death in *Candida albicans* yeast and hyphal cells preventing biofilm formation *in vitro* and in a rodent central venous catheter model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. January, p. AAC.02659-15, 2016.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319–327, 2007.

ALVAREZ, J. F.; KONOPKA, J. B. . Identification of N-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in *Candida albicans*. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. March, p. 965–975, 2007.

ANDES, D. R. et al. The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society**, n. March, p. 921–931, 2016.

ARAUJO et al. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays. **Natural Products Research**, v. 25, n. 11, p.1037-1064, 2011.

ARIF, T. et al. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621–638, 2009.

ARONOFF, D. M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 1, p. 559–565, 2004.

ARORA, B. et al. Bio-ChemiaeActa Bio-ChemiaeActa. **Bio-chemiae acta**, v. 1, n. 1, p. 77–86, 2016.

ASZALOS, A. Physico-chemical and microbiological comparison of nystatin, amphotericin A and amphotericin B and structure of amphotericina A. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 2, p. 1699-1713, 1985.

AZEVEDO, R. V. P. et al. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: Maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 335–341, 1999.

BACHIEGA, T.F. et al. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. **Phytotherapy Research**, 2012.

- BALISH, E. et al. Susceptibility of germfree phagocyte oxidase- and nitric oxide synthase 2-deficient mice, defective in the production of reactive metabolites of both oxygen and nitrogen, to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1313–1320, 2005.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 114–7, 22 ago. 2005.
- BARLAK, Y. et al. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. **Proteome science**, v. 9, p. 74, 2011.
- BARUD, H. DA 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**, v. 2013, p. 703024, 2013.
- BENKOVIC, V. et al. Radioprotective effects of propolis and quercetin in irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay **Phytomedicine**, vol.15, no. 10, pp. 851–858, 2008.
- BERGAMASCO, M. D. et al. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 256–263, 2013.
- 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**, v. 13, p.64180, 2013.
- BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, p. S53–S63, nov. 2002.
- BRANZK, N. et al. Europe PMC Funders Group Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. v. 15, n. 11, p. 1017–1025, 2015.
- BROWN, G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 1–21, 2011.
- BROWN, G. D. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts INNATE ANTIFUNGAL IMMUNITY : THE KEY ROLE OF PHAGOCYTES. n. 3, p. 1–21, 2012.
- BÚFALO, M. C. et al. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharma and Pharmacology** p. 1497–1504, 2014.
- BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 740–745, 2015.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

BYRD, A. S. et al. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 8, p. 4136–48, 2013.

CANTORNA, M. T.; BALISH, E. Acquired immunity to systemic candidiasis in immunodeficient mice: role of antibody to heat-shock protein 90. **J Infect.Dis.**, v. 166, n. 5, p. 1193–1195, 1992.

CAPISTRANO, H. M. et al. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 947980, 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**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785–794, 2015.

CHENG, S.-C. et al. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. **Infection and immunity**, v. 80, n. 4, p. 1304–13, abr. 2012.

CONTI, H.R. et al.. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. **Journal. Experimental. Med.**, 206 :299–311, 2009.

CONTI, H. R.; GAFFEN, S. L. NIH Public Access. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 75, p. 518–527, 2010.

CONTI H.R , et al. Oral-resident natural Th17 cells and $\gamma\delta$ T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. **Journal Experimental. Med.**; 211:2075–2084, 2013.

CORNISTEIN, W. et al. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. **Medicina Clinica**, v. 31, n. 6, p. 380–384, 2014.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S. et al. Determination of chitin content in fungal cell wall: An alternative flow cytometric method. **Cytometry Part A**, v. 83 A, n. 3, p. 324–328, 2013.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009.

CUESTA, A. et al. In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream

innate immune responses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, n. 1, p. 71–80, 2005.

DANIEL, H. M.; LACHANCE, M. A.; KURTZMAN, C. P. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 67–84, 2014.

DE CASTRO, P. A. et al. Molecular Characterization of Propolis-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 3, p. 398–411, 2011.

DE CASTRO, P. A. et al. Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 74–86, 2013.

DE GROOTE, M. A.; FANG, F. C. NO Inhibitions : Antimicrobial Properties of Nitric Oxide In: DE GROOTE, M. A.; SOURCE, F. C. Clinical Infectious Diseases. **Braude Memorial Symposium on Infectious Diseases**, v. 21, Oct. 1995.

DE REPENTIGNY, L.; GOUPIL, M.; JOLICOEUR, P. Oropharyngeal Candidiasis in HIV Infection: Analysis of Impaired Mucosal Immune Response to *Candida albicans* in Mice Expressing the HIV-1 Transgene. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 2, p. 406–21, 2015.

DE VITA, D. et al. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 24, p. 5931–5935, 2016.

DIMOV et al. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v 22, 155-162, 1991.

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 . Email Alerts Information about subscribing to The Journal of Immu. **The Journal of Immunology**, v. 7, n. 141, p. 2407–2412, 1988.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DUGGAN, S. et al. Host response to *Candida albicans* bloodstream infection and sepsis. **Virulence**, v. 5594, n. April 2015, p. 1–11, 2015.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and othe. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2766–71, 2005.

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.; JONG, D. de; BASTOS, J. K. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. v. 8, n. 2, p. 635–640, 2009.

FATAHINIA, M.; KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H. Propolis efficacy on TNF- α , IFN- γ and IL 2 cytokines production in old mice with and without systemic candidiasis. **Journal de mycologie médicale**, p. 237–242, 2012.

FIDEL, P. L. Candida-Host Interactions in HIV Disease: Relationships in Oropharyngeal Candidiasis. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 1, p. 45–49, 2011.

FIDER, L.P.JR.; NOVERR, M. C. Mucosal immunity of *Candida albicans*. *Candida and Candidiasis*. 2^a ED. Asm Press, WASHINGTON, DC, 2012.

FIGUEIREDO, A. S. et al. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time. **PCR**. v. 1, p. 1669–1680, 2009.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1185–1197, 2013.

GALÈS, A. et al. PPAR γ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000714, jan. 2010.

GAO et al. Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. **Journal Clinic Biochemistry Nutrition**, v.55, p.1-7 (2014).

GARDANA, C. et al. Biotransformation Strategy To Reduce Allergens in Propolis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4654–4658, 2012.

GIL, L. M.; GOZALBO, D. About the role of TLR2 and TLR4 in cytokine secretion by murine macrophages in response to *Candida albicans*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 1–2, 2006a.

GIL, M. L.; GOZALBO, D. TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2299–2304, jul. 2006b.

GOW, N. A. R. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, 2011.

GOW, N. A. R.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 406–412, 2012.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5–10, 2014.

GUNSALUS, K. T. W. et al. Manipulation of Host Diet To Reduce Gastrointestinal Colonization by the Opportunistic Pathogen *Candida albicans*. **mSphere**, v. 1, n. 1, p. e00020-15, 2015.

GUPTA, M. et al. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L . seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. v. 72, p. 151–156, 2000.

GUZMAN, J. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. **Molecule**, v. 19, 2014.

HA, J. F. et al. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 181–195, 2011.

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.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 176–180, 2001.

HROMATKA, B. S.; NOBLE, S. M.; JOHNSON, A. D. Transcriptional Response of *Candida albicans* to Nitric Oxide and the Role of the YHB1 Gene in Nitrosative Stress and Virulence. **Molecular biology of the cell**, v. 16, p. 4814–4826, 2005.

HU, F. et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 276–283, set. 2005.

HUANG, G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2012.

HUPPLER, A. et al. Neutrophils Do Not Express IL-17A in the Context of Acute Oropharyngeal Candidiasis. **Pathogens**, v. 4, n. 3, p. 559–572, 2015.

IVANOVSKA, N. et al. Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation , cytokine release and *Klebsiella* infection in mice. **Apidologie**, v 26, 73-81 : 1995.

JABRA-RIZK, M. A. et al. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting Within the "Host-Microbe Damage Response Framework". **Infection and immunity**, v. 84, n. 10, p. 2724–2739, 2016.

JASPRICA, I. et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 3, p. 548–554, 2007.

KHOSRAVI, A. R. et al. Immunomodulatory effect of propolis in tumor-bearing mice with candidiasis. **Journal de Mycologie Medicale**, p. 1–6, 2014.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 49, n. 2, p. 171–177, 2011.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, mar. 1999.

KULLBERG, B. J. et al. Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 26, n. 3–4, p. 299–307, 1999.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, fev. 2004.

KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 964149, 2013.

LALLO, M. A.; JOSÉ, M.; BONDAN, F. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. **Experimental Encephalitozoon cuniculi infection in dexamethasone-immunosuppressed mice**. v. 36, n. 5, p. 621–626, 2002.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LEFÈVRE et al. PPAR γ Ligands Switched High Fat Diet-Induced Macrophage M2b Polarization toward M2a Thereby Improving Intestinal *Candida* Elimination. **Plos One**, v 5, , 2010.

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**, v. 27, n. 11, p. 1834–1839, 2004.

LEWIS, R. E.; VIALE, P.; KONTOYIANNIS, D. P. The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. **Virulence**, v. 3, n. 4, p. 368–376, 2012.

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**, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.

LIONAKIS, M. S.; NETEA, M. G. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003079, 2013.

- LIU, D. et al. Antioxidant activity of polysaccharide fractions extracted from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 1–5, 2013.
- LOPES, J. P. et al. Opportunistic pathogen *Candida albicans* elicits a temporal response in primary human mast cells. **Scientific Reports**, v. 5, n. July, p. 12287, 2015.
- LOTFY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. v. 7, p. 22–31, 2006.
- LOTZ, H.; BRUNNER, H.; RUPP, S. US 2007/0196378 A1. **US 2007/0196378 A1**, v. 1, n. 19, 2007.
- LUO, S. et al. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 3, p. 161–169, 2013.
- MACHADO, J. L. et al. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2012, 2012.
- MACIEL, M. C. G. et al. *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 8, p. 57, 2008.
- MARTEL, C. M. et al. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14 α -demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3578–3583, 2010.
- MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 2013.
- MAUBON et al. Resistance of *Candida* spp to antifungal drugs in the ICU: where are we now?. **Intensive Care Med**, 40:1241-1255, 2014.
- MIRAMÓN, P. et al. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. **PloS one**, v. 7, n. 12, p.52850, 2012.
- 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**, v. 55, n. 6, p. 441–449, 1996.
- MISSIMA, F. Green Brazilian Propolis Action on Macrophages and Lymphoid Organs of Chronically Stressed Mice. **Ecamm** v. 5, n. 2007, p: 71–75, 2008
- MORATO-MARQUES, M. et al. Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage anti-fungal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 33, p. 28902–

28913, 2011.

MOYES, D. L. et al. Candida albicans yeast and hyphae are discriminated by MAPK signaling in vaginal epithelial cells. **PLoS one**, v. 6, n. 11, p. e26580, 2011.

NAGLIK, J. et al. Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 915–926, 2004.

NAGLIK, J. R. et al. Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 12–13, p. 963–76, nov. 2011.

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**, v. 10, n. 2, p. 1–19, 2015.

NETEA, M. G. et al. Toll-Like Receptor 2 Suppresses Immunity against Candida albicans through Induction of IL-10 and Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 6, p. 3712–3718, 2004.

NETEA, M. G. et al. An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system. **Nat Rev Micro**, v. 6, n. 1, p. 67–78, jan. 2008.

NETEA, M. G. et al. Immune defence against Candida fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 10, p. 630–642, Sep. 2015.

NETT, J.; ANDES, D. Candida albicans biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 340–345, 2006.

NEVILLE, B. A.; D’ENFERT, C.; BOUGNOUX, M. E. Candida albicans commensalism in the gastrointestinal tract. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 7, p. 1–13, 2015.

NINOMIYA, M. et al. Efficacy of micafungin against deep-seated candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 587–590, 2005.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

OLIVEIRA, A. C. P. et al. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. August, p. 493–497, 2006.

ORSATTI, C. L. et al. Th1/Th2 cytokines’ expression and production by propolis-treated mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 314–8, 16 jun. 2010.

OTA, C. et al. Antifungal activity of propolis on different species of Candida È t von Propolis

gegen verschiedene Antimyzetische Aktivita. v. 378, p. 375–378, 2001.

PAGLIARONE, A. C. et al. International Immunopharmacology Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 11, p. 1352–1356, 2009a.

PAGLIARONE, A. C. et al. Propolis effect on Th1 / Th2 cytokines production by acutely stressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 230–233, 2009b.

PATIL, N. K.; BOHANNON, J. K.; SHERWOOD, E. R. Immunotherapy: A promising approach to reverse sepsis-induced immunosuppression. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 688–702, 2016.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European journal of pharmacology**, v. 587, n. 1–3, p. 296–301, 10 jun. 2008.

PETERS, B. M. et al. Candida vaginitis: When opportunism knocks the host responds.. **PloS Pathogens**, 2014a.

PETERS, B. M. et al. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during Candida albicans vaginitis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 532–543, 2014b.

PIROFSKI, L.; CASADEVALL, A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 2, p. 269–273, 2009.

POSSAMAI, M. M. et al. Brazilian Propolis: A Natural Product That Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes. v. 2013, 2013.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

QUINTIN, J. et al. Differential role of NK cells against Candida albicans infection in immunocompetent or immunocompromised mice. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 8, p. 2405–2414, 2014.

REIS, C. M. F. et al. **Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis**.Pdf, 2000.

REPENTIGNY et al. Oropharyngeal Candidiasis in HIV Infection: Analysis of Impaired Mucosal Immune Response to Candida albicans in Mice Expressing the HIV-1 Transgene. **Pathogens**, v. 4, 406-421. (2015)

RIOS, C. E. P.; ABREU, A. G.; FILHO, J. A. F. B. 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**, v. 8, n. February, p. 1–7, 2017.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocologia**. Tradução de Benedetti, I. C e Supervisão Científica de Bastos, J. K. e outros. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROCHA, B. A. et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Increased water solubility of the chemical constituents and antioxidant activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 87–94, 2012.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 4, p. 275–88, abr. 2011.

SAIJO, S.; IWAKURA, Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. **International Immunology**, v. 23, n. 8, p. 467–472, 2011.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33–38, 2005.

SALOMÃO, K. et al. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence -Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

SÁNCHEZ-REYES, K. et al. Cervical cancer cell supernatants induce a phenotypic switch from U937-derived macrophage-activated M1 state into M2-like suppressor phenotype with change in toll-like receptor profile. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SANTOS, S. et al. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. **Evidence -Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

SAVILLE, S. P. et al. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albic*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 1053–60, 2003.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 5, p. 3201–3208, 2006.

SEREZANI et al. Leukotriene B4 amplifies NF- κ B activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. **the Journal of Clinical Investigation**, v.121, p. 671-682, (2011)

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 1, p. 139–144, 2001.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011.

SILVA, S. et al., Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species **Cell Press**, v.19, p. 241.247. 2013.

SOBEL, J. D. et al. Candida Urinary Tract Infections--Epidemiology. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. Supplement 6, p. S433–S436, 2011.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15–21, 2016.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–13, 2013.

STRASSER, D. et al. Syk Kinase-Coupled C-type Lectin Receptors Engage Protein Kinase C- δ to Elicit Card9 Adaptor-Mediated Innate Immunity. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 32–42, 2012.

SUDBERY, P. E. Growth of Candida albicans hyphae. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737–748, 2011.

TAFF. Mechanisms of Candidabiofilm drug resistance Access. v. 8, n. 10, p. 1–19, 2014.

TAMIR, S. et al. DNA Damage and genotoxicity by nitric oxide./**Methods Enzymol**, p. 230–243, 1996.

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. v. 29, n. 1, p. 96–99, 2006.

TAVARES, D. C. et al. Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rats. **Planta Medica**, v. 73, n. 15, p. 1531–1536, 2007.

TOBALDINI-VALERIO, F. K. et al. Propolis: a potential natural product to fight Candida species infections. **Future microbiology**, v. 11, p. 1035–1046, 2016.

TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. Candida biofilms and the host: Models and new concepts for eradication. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans and hyphal forms. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 668–676, 2006.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 354–361, 2006.

WANG, Y. Looking into *Candida albicans* infection , host response , and antifungal strategies. n. June, p. 2014–2016, 2015.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. HHS Public Access. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42–52, 2015.

WHO. Antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–94, 2014.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, n. 2011, p. 1–11, 2011.

XUAN, H. et al. Inhibitory Effect of Chinese Propolis on Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Activity in Vascular Endothelial Cells. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

YALFANI, R.; KHOSRAVI, A.; PIROUZ, B. Evaluation of the antifungal activity of Iranian propolis against *Candida albicans*. **African Journal of Microbiology Reserch**, v. 7, n. 35, p. 4457–4464, 2013.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

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.

FINALIDADE	<input type="checkbox"/> ENSINO <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISA <input type="checkbox"/> EXTENSÃO
Vigência da autorização	4 ANOS
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> (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

Lucilene Amorim Silva

Profª. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

Therapeutic potential of biodegradable microparticles containing *Punica granatum* L. (pomegranate) in murine model of asthma

Jéssica F. F. de Oliveira · Diego V. Garroto · Mayara C. P. da Silva ·
 Thiane S. Fortes · Rejane B. de Oliveira · Flávia R. F. Nascimento ·
 Fernando R. Da Costa · Marcos A. G. Grisotto · Roberto Nicolete

Received: 26 May 2013 / Accepted: 5 August 2013 / Published online: 29 August 2013
 © Springer Basel 2013

Abstract

Objective and design Among the options for treatment of diseases affecting the respiratory system, especially asthma, drug delivering systems for intranasal application represent an important therapeutic approach at the site of inflammation. The present study aimed to evaluate the therapeutic effect of biodegradable microparticles formed by poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) containing encapsulated pomegranate extract on a murine model of asthma. **Material** The extract was acquired from the leaves of *P. granatum* and characterized qualitatively by HPLC. A *vol/vol* emulsion solvent extraction–evaporation method was chosen

to prepare the microparticles containing pomegranate encapsulated extract (MP).

Treatment OVA-sensitized BALB/c mice were used as asthma model and treated with dexamethasone and *P. granatum* extract in solution form or encapsulated into microparticles.

Results MP were able to inhibit leukocytes' recruitment to bronchoalveolar fluid, especially, eosinophils, decreasing cytokines (IL-1 β and IL-5) and protein levels in the lungs.

Conclusions This approach can be used as an alternative/ supplementary therapy based on the biological effects of *P. granatum* for managing inflammatory processes, especially those with pulmonary complications.

Responsible Editor: J Zhang.

J. F. F. de Oliveira · M. A. G. Grisotto · R. Nicolete
 Pós-Graduação de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão,
 Universidade CEUMA (UNICEUMA), Rua Josef Monelli, 1,
 São Luís, Maranhão 65075-120, Brazil

D. V. Garroto
 Instituto Florence de Ensino, Rua Rio Branco, 216, São Luís,
 Maranhão, Brazil

M. C. P. da Silva · T. S. Fortes · F. R. F. Nascimento
 Department of Pathology, Laboratory of Immunophysiology,
 Biological and Health Sciences Center, Federal University of
 Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão 65085-500, Brazil

R. B. de Oliveira · F. R. Da Costa
 Departamento de Ciências Farmacéuticas, Faculdade de Ciências
 Farmacéuticas do Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
 Av. do Café s/n, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-903, Brazil

R. Nicolete (✉)
 Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde, Fundação
 Oswaldo Cruz—Fiocruz Rondônia, Rua da Beira 7671, Porto
 Velho, Rondônia 76812-245, Brazil
 e-mail: rnicolete@gmail.com

Keywords *Punica granatum* L. · Inflammation ·
 Asthma · Microparticles · Poly(lactic-co-glycolic acid)

Introduction

Asthma is chronic lung disease that involves many inflammatory cells and proteins. The complex inflammatory disorder that characterizes asthma is associated with eosinophilic inflammation, airway hyperresponsiveness, and hypersecretion of mucus by goblet cells [1, 2]. Inhaled corticosteroids are effective in treating chronic asthma, but the adverse side effects displayed by these substances severely limit their long-term use [3]. The extracts of numerous plants are reported as potent therapeutic materials in various diseases, including inflammatory processes such as asthma [4–8]. Experimental models to screen the pharmacologic activities of plant extracts well as isolated compounds (secondary metabolites) have been used with success in the course of a continued search for bioactive natural products derived from plants [8–10].



Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L.

Dalila Nunes Cysne¹ · Thiane Silva Fortes¹ · Aranyss Silva Reis^{1,2,3} · Bruno de Paulo Ribeiro⁴ · Amália dos Santos Ferreira⁴ · Flávia Maria Mendonça de Amaral⁵ · Rosane Nassar Meireles Guerra¹ · Claudio Romero Farias Marinho² · Roberto Nicoletti^{6a} · Flávia Raquel Fernandes Nascimento¹

Received: 18 April 2016 / Accepted: 27 July 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract In an effort to identify novel therapeutic alternatives for the treatment of malaria, the present study evaluated the antimalarial effect of the crude hydroalcoholic extract (HCE) from the leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. For this purpose, the molecular affinity between the total proteins from erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* and HCE or chloroquine was evaluated by surface plasmon resonance (SPR). Subsequently, the plasmodicidal potential of HCE was assessed in a *P. falciparum* culture. Using BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* intraperitoneally (ip.), we evaluated the effects of ip. treatment, for three consecutive days (day 7, 8, and 9 after infection), with chloroquine (45 mg/kg) or HCE (5 mg/kg), considering the survival index and the parasitaemia. The groups were compared to an untreated control group that receives only PBS at the same

periods. The results indicated that HCE could bind to the total proteins of infected erythrocytes and could inhibit the parasite growth in vitro (IC₅₀ = 25.4 µg/mL). The in vivo therapeutic treatment with HCE increased the survival and decreased the parasitaemia in the infected animals. Therefore, the HCE treatment exhibited a significant antiplasmodial effect and may be considered as a potential candidate for the development of new antimalarial drugs.

Keywords *Chenopodium ambrosioides* · *Plasmodium* · Malaria · Treatment

Introduction

Malaria continues to pose a challenge to global public health (Liu et al. 2013). In 2013, approximately 198 million cases and 584,000 deaths due to malaria were reported worldwide (World Health Organization 2014). Five species of *Plasmodium* parasites are known to cause this disease in humans (Kantele and Jokiranta 2011). Despite the greater geographical distribution of *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* deserves attention because it is responsible for the largest number of severe cases and deaths (World Health Organization 2014).

Currently, artemisinin-based combination therapies are the treatment of choice for falciparum malaria (World Health Organization 2014) because of the reported resistance of malaria parasites to other antimalarials, including chloroquine (Hyde 2002; Juge et al. 2015). However, resistance to artemisinin has been reported in five Asian countries: Cambodia, Laos, Myanmar, Thailand, and Vietnam (World Health Organization 2013, 2014). Moreover, a safe, effective, and globally available vaccine against the disease is not yet available. For this reason, the search for new antimalarial drugs is crucial and necessary.

✉ Flávia Raquel Fernandes Nascimento
nascimento09@yahoo.com.br

¹ Laboratory of Immunophysiology, Department of Pathology, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão (UFMA), 65080-805 São Luís, Brazil

² Department of Parasitology, Laboratory of Experimental Immunoparasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

³ Medical College, Center of Social Sciences, Health and Technology, Federal University of Maranhão (UFMA), 65900-410 Inoparaná, Brazil

⁴ Laboratory of Biotechnology Applied to Health, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz-Roraima), 76812-245 Povo Velho, RO, Brazil

⁵ Department of Pharmacy, Laboratory of Herbal Medicine, Center of Biological Sciences and Health, Federal University of Maranhão (UFMA), 65085-580 São Luís, Brazil

⁶ Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz-Coar), 60175-047 Fortaleza, CE, Brazil

Author Guidelines

1. Summary Table

- Please view the table below for a summary on currently accepted article types and general manuscript style guidelines. Article types may vary depending on journal.

	Abstract (max. length)	Running title (5 words)	Figures and/or tables (combined)	Manuscript max. length	Peer review	Author fees	Submitted to PubMed Central or other indexing databases
Book Review	✗	✗	1	1'000 words	✓	✗	✓
Classification	250 words	✓	10	2'000 words	✓	✓	✓
Case Report	350 words	✓	4	3'000 words	✓	✓	✓
Clinical Trial	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Code	250 words	✓	3	3'000 words	✓	✓	✓
Community Case Study	350 words	✓	5	5'000 words	✓	✓	✓
Conceptual Analysis	350 words	✓	10	8'000 words	✓	✓	✓
CPC	250 words	✓	6	2'500 words	✓	✓	✓
Curriculum, Instruction	350	✓	5	5'000	✓	✓	✓

	words			words			
, and Pedagogy							
Data Report	✗	✓	2	3'000 words	✓	✓	✓
Editorial	✗	✗	0	1'000 words*	✓	✗	✓
Empirical Study	350 words	✓	10	8'000 words	✓	✓	✓
Evaluation	350 words	✓	5	6'000 words	✓	✓	✓
Field Grand Challenge	✗	✓	1	2'000 words	✓	✗	✓
Focused Review ⁽¹⁾	350 words	✓	5	5'000 words	✓	✗	✓
Frontiers Commenta ry ⁽¹⁾	✗	✗	1	1'000 words	✓	✗	✓
General Commenta ry	✗	✗	1	1'000 words	✓	✗	✓
Hypothesis and Theory	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Methods	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Mini Review	250 words	✓	2	3'000 words	✓	✓	✓
Opinion	✗	✓	1	2'000 words	✓	✓	✓
Original Research	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Protocols	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓

Perspective	250 words	✓	2	3'000 words	✓	✓	✓
Policy Brief	125 words	✓	5	3'000 words	✓	✓	✓
Research Snapshot	50 words	✓	1	500 words	✓	✓	✓
Review	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Specialty Grand Challenge	✗	✓	1	2'000 words	✓	✗	✓
Systematic Review	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓
Technology Report	350 words	✓	15	12'000 words	✓	✓	✓

- (1) Tier 2 article - field level article reserved to authors of selected Tier 1 articles.

- * Editorials for Research Topics with 5 to 10 published articles have a maximum of 1'000 words, for Research Topics with more than 10 published articles the following applies: 1'100 words for 11 articles, 1'200 for 12 articles, 1'300 for 13 articles etc. up to maximum 5'000 words, for 50 or more papers.

- Appendices and footnotes will be considered in the total length and word count of the article.

2. Manuscript Guidelines

- Registration with Frontiers

Please note that the corresponding and all submitting authors MUST [register](#) with Frontiers before submitting an article. You must be logged in to your personal Frontiers Account to submit an article.

For any co-author who would like his/her name on the article abstract page and PDF to be linked to a Frontiers profile on the [Loop network](#), please ensure to [register](#) before the final publication of the paper.

- Original Content

Frontiers publishes only original content. It therefore requires that all submissions must consist as far as possible of content that has not been published previously. In accordance with [COPE guidelines](#), we expect that “original wording taken directly from publications

by other researchers should appear in quotation marks with the appropriate citations.” This condition also applies to an author’s own work, and to submissions adapted from conference abstracts and proceedings papers, please see the following sections for more information

○ **Theses and Dissertations**

In submitted manuscripts, Frontiers allows the inclusion of content which first appeared in an author’s thesis so long as this represents the only medium it has appeared in, is in line with the author’s university policy, and can be accessed online. If the thesis is not archived online, it is considered as original, unpublished data and thus is subject to the unpublished data restrictions of some of our article-types. This inclusion should be noted in the Acknowledgements section of the manuscript and the thesis should be cited and referenced accordingly in the Reference list. For some examples, please check our [References section](#).

○ **Conferences, Proceedings and Abstracts**

Manuscripts which first appeared as conference papers can be considered as original work if expanded upon. As a rule of thumb, at least 30% of content must be original. Authors submitting such work are required to:

1. Cite the conference in the Acknowledgements section, or the references section if applicable
2. Seek permission for reuse of the published conference paper if the author does not hold the copyright

○ **Blogs**

Although permissible, extended manuscript content which has previously appeared online in non-academic media e.g. blogs, should be declared at the time of submission in a cover letter or in communication with the relevant editorial office for consideration.

• **Article Type**

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript, and to comply to the article type descriptions defined in the journal’s “Article Types”, which can be seen from the “For Authors” menu on any Frontiers journal page. **Please pay close attention to the word count limits.** *Focused Reviews, Frontiers Commentaries and Grand Challenge articles* are invited by the chief editor and cannot be part of any Frontiers Research Topic. Unless you were contacted by the chief editor or the editorial office regarding the submission of a paper selected for tier 2 promotion, do not submit a Focused Review or a Frontiers Commentary - instead, submit a Review or a General Commentary.

Please see [Additional Requirements](#) for specific article types including Focused Reviews, General Commentaries, Protocols and Data Reports.

• **Manuscript Length**

Frontiers encourages its authors to closely follow the article word count lengths given in the [Summary Table](#). The manuscript length includes only the main body of the text, footnotes and all citations within it, and excludes abstract, section titles, figure and table captions, funding statements, acknowledgements and references in the bibliography. Please indicate the number of words and the number of figures included in your manuscript on the first page.

- Language Editing

Frontiers requires manuscripts submitted to meet international standards for English language to be considered for publication.

For authors who would like their manuscript to receive language editing or proofing to improve the clarity of the manuscript and help highlight their research, Frontiers recommends the language-editing service provided by our external partner Charlesworth Group Author Services, who has a long standing track record in language editing. This is a third-party service for which Frontiers authors will receive a discount by visiting the following link: <http://www.charlesworthauthorservices.com/~Frontiers>.

Note that sending your manuscript for language editing does not imply or guarantee that it will be accepted for publication by a Frontiers journal. Editorial decisions on the scientific content of a manuscript are independent of whether it has received language editing or proofing by the Charlesworth Group Author Services, or other services.

- Language Style

The default language style at Frontiers is American English. If you prefer your article to be formatted in British English, please specify this on your manuscript first page. For any questions regarding style Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

- Search Engine Optimization (SEO)

There are a few simple ways to maximize your article's discoverability. Follow the steps below to improve search results of your article:

- Include a few of your article's [keywords](#) in the title of the article;
- Do not use long article [titles](#);
- Pick 5 to 8 keywords using a mix of generic and more specific terms on the article subject(s);
- Use the maximum amount of keywords in the first 2 sentences of the [abstract](#);
- Use some of the keywords in level 1 [headings](#).

- Title

The title is written in title case, centered, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page.

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title.

Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative.

Authors should try to avoid, if possible:

- - Titles that are a mere question without giving the answer.
 - Unambitious titles, for example starting with "Towards", "A description of", "A characterization of", "Preliminary study on".
 - Vague titles, for example starting with "Role of...", "Link between...", "Effect of..." that do not specify the role, link, or effect.
 - Include terms that are out of place, for example the taxonomic affiliation apart from species name.

For Corrigenda, Book Reviews, General Commentaries and Editorials, the title of your manuscript should have the following format:

- "Corrigendum: Title of original article"
- "Book Review: Title of book"
- General Commentaries
 - "Commentary: Title of original article" (This does not apply to [Frontiers Commentaries](#))
 - "Response: Commentary: Title of original article"
- "Editorial: Title of Research Topic"
- For article types requiring it, the running title should be a maximum of 5 words in length. (see [Summary Table](#))
- Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

Example: Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA.

The Corresponding Author(s) should be marked with an asterisk. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section.

Correspondence:

Max

maximus@gmail.com

Maximus

If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

- Headings and Sub-headings

Except for special names (e.g. GABAergic), capitalize only the first letter of headings and subheadings. Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold. You may insert up to 5 heading levels into your manuscript (not more than for example: 3.2.2.1.2 **Heading title**).

- Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. In the abstract, minimize the use of abbreviations and do not cite references. The text of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman. See [Summary Table](#) for abstract requirement and length according to article type.

For Clinical Trial article types, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

- Keywords

All article types: you may provide up to 8 keywords; at least 5 are mandatory.

- Text

The body text is in 12 point normal Times New Roman. New paragraphs will be separated with a single empty line. The entire document should be single-spaced and should contain page and line numbers in order to facilitate the review process. Your manuscript should be written using either LaTeX or MS-Word.

- Nomenclature

- The use of abbreviations should be kept to a minimum. Non-standard abbreviations should be avoided unless they appear at least four times, and defined upon first use in the main text. Consider also giving a list of non-standard abbreviations at the end, immediately before the Acknowledgments.

- Equations should be inserted in editable format from the equation editor.
- Gene symbols should be italicized; protein products are not italicized.
- Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by [IUPAC](#).
- We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts.
- Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords. An LSID is represented as a uniform resource name (URN) with the following format:

urn:lsid::[:]

For more information on LSIDs please see [Inclusion of Zoological Nomenclature](#) section

- Sections

Your manuscript is organized by headings and subheadings. For Original Research Articles, Clinical Trial Articles, and Technology Reports the section headings should be those appropriate for your field and the research itself.

For Original Research Articles, it is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field:

0. **Introduction**

Succinct, with no subheadings.

1. **Material and Methods**

This section may be divided by subheadings. This section should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section (for further information, see [here](#))

2. **Results**

This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and have to be transferred into the main text.

3. **Discussion**

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential short-comings and limitations on their interpretations; discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future.

For further information, please see [Additional Requirements](#) for specific article types including Focused Reviews, General Commentaries, Case Reports and Data Reports amongst others or you can check the descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page.

- Conflict of Interest Statement

Frontiers follows the recommendations by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/author-responsibilities--conflicts-of-interest.html>) which require that all financial, commercial or other relationships that might be perceived by the academic community as representing a potential conflict of interest must be disclosed. If no such relationship exists, authors will be asked to declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. When disclosing the potential conflict of interest, the authors need to address the following points:

- Did you or your institution at any time receive payment or services from a third party for any aspect of the submitted work?
- Please declare financial relationships with entities that could be perceived to influence, or that give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.
- Please declare patents and copyrights, whether pending, issued, licensed and/or receiving royalties relevant to the work.
- Please state other relationships or activities that readers could perceive to have influenced, or that give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

- Authors and Contributors

When determining authorship the following criteria should be observed:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributors who meet fewer than all 4 of the above criteria for authorship should not be listed as authors, but they should be acknowledged.

The Author Contributions section is mandatory for all articles, including articles by sole authors. If an appropriate statement is not provided on submission, a standard one will be inserted during the production process. The Author Contributions statement must describe the contributions of individual authors and, in doing so, all authors agree to be accountable for the content of the work. Please list only 2 initials for each author, without periods, but separated by commas (e.g. JC, JS). In the case of two authors with the same initials, please use their middle initial to differentiate between them (e.g. REW, RSW). The Author Contributions section should be included at the end of the manuscript before the References.

- Funding

Details of all funding sources should be provided, including grant numbers if applicable. Please ensure to add all necessary funding information, as after publication this is no longer possible.

- Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors.

- References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. The references should only include articles that are published or accepted. Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list, include the version and unique identifier when available. For accepted but unpublished works use "in press" instead of page numbers. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only, for the article types that allow such inclusions. Personal communications should be documented by a letter of permission. Website urls should be included as footnotes. Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source.

The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

- **SCIENCE, ENGINEERING, and HUMANITIES: For articles submitted in the domains of SCIENCE, ENGINEERING and HUMANITIES please apply Author-Year system for in-text citations.**

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al and [doi](#) when available.

In-text citations should be called according to the surname of the first author, followed by the year. For works by 2 authors include both surnames, followed by the year. For works by more than 2 authors include only the surname of the first author, followed by *et al.*,

followed by the year. For Humanities and Social Sciences articles please include page numbers in the in-text citations.

Article in a print journal:
Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell*.5, 163-172.

Article in an online journal:
Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book:
Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

Book:
Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

Abstract:
Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A world apart? Bridging the gap between theory and applied social gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

Patent:
Marshall, S. P. (2000). *Method and apparatus for eye tracking and monitoring pupil dilation to evaluate cognitive activity*. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Data:
[Dataset] Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. (2015) Data from: Massive sequencing of Ulms minor's transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository.<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and Dissertations:
Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to the [Chicago Manual of Style](#).

[Frontiers Science Endnote Style](#)

[Frontiers Science, Engineering and Humanities Bibstyle](#)

○ **HEALTH, PHYSICS AND MATHEMATICS:** For articles submitted in the domain of HEALTH or the journal *Frontiers in Physics* and *Frontiers in Applied Mathematics and Statistics* please apply the Vancouver system for in-text citations.

Reference list: provide the names of the first six authors followed by et al and [doi](#) when available.

In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis for Health articles, and in square brackets for Physics and Mathematics articles.

Article in a print journal:
Sondheimer N, Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell* (2000) **5**:163-72.

Article in an online journal:
Tahimic CGT, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol* (2013) **4**:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

Article or chapter in a book:
Sorenson PW, Caprio JC. "Chemoreception,". In: Evans DH, editor. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press (1998). p. 375-405.

Book:
Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press (1997). 345 p.

Abstract:
Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, editor. *Genetic Programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland*. Berlin: Springer (2002). p. 182–91.

Patent:
Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. *Flexible Endoscopic Grasping and Cutting Device and Positioning Tool Assembly*. United States patent US 20020103498 (2002).

Data:
[Dataset] Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of *Ulms minor*'s transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015) <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

Theses and Dissertations:
Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

For examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to [Citing Medicine](#).

[Frontiers Health Endnote Style](#)

[Frontiers Health and Physics Bibstyle](#)

- Disclaimer

Any necessary disclaimers which must be included in the published article should be clearly indicated in the manuscript.

- Supplementary Material

Frontiers journals do not support pushing important results and information into supplementary sections. However, data that are not of primary importance to the text, or which cannot be included in the article because it is too large or the current format does not permit it (such as movies, raw data traces, power point presentations, etc.) can be uploaded during the submission procedure and will be displayed along with the published article.

The Supplementary Material can be uploaded as Data Sheet (word, excel, csv, cdx, fasta, pdf or zip files), Presentation (power point, pdf or zip files), Supplementary Image (cdx, eps, jpeg, pdf, png or tif), Supplementary Table (word, excel, csv or pdf), Audio (mp3, wav or wma) or Video (avi, divx, flv, mov, mp4, mpg, mpeg or wmv).

Supplementary material is not typeset so please ensure that all information is clearly presented, the appropriate caption is included in the file and not in the manuscript, and that the style conforms to the rest of the article. For Supplementary Material templates (LaTeX and Word) see [Supplementary Material for Frontiers](#).

- Word Files

If working with Word please use [Frontiers Word](#).

- LaTeX Files

If you wish to submit your article as LaTeX, we recommend our [Frontiers LaTeX templates](#). These templates are meant as a guide, you are of course welcome to use any style or formatting and Frontiers journal style will be applied during typesetting.

When submitting your article please ensure to upload **all** relevant manuscript files including:

- - tex file
 - PDF
 - .bib file (if the bibliography is not already included in the .tex file)
- Figures should be included in the provided pdf. In case of acceptance, our Production Office might require [high resolution files](#) of the figures included in the manuscript in eps, jpg or tif format. In order to be able to upload more than one figure at a time, save the figures (labeled in order of appearance in the manuscript) in a zip file, and upload them as ‘Supplementary Material Presentation’.

To facilitate the review process, please include a Word Count at the beginning of your manuscript, one option is texcount which also has an online interface.

3. Additional Requirements

- CrossMark Policy

[CrossMark](#) is a multi-publisher initiative to provide a standard way for readers to locate the current version of a piece of content. By applying the CrossMark logo Frontiers is committing to maintaining the content it publishes and to alerting readers to changes if and when they occur. Clicking on the CrossMark logo will tell you the current status of a document and may also give you additional publication record information about the document.

Frontiers follows the COPE guidelines for retractions. For our procedure regarding corrections please see the [section below](#). Corrigenda and errata are linked to the original article. Articles are only directly updated in case the correction affects the citation of the publication.

- Corrections

If you need to communicate important, scientifically relevant errors or missing information, please submit a Correction, detailing the reason(s) for and location(s) of the change(s) needed in the cover letter. The title of the submission should have the following format: "Corrigendum: Title of original article". You are advised to use the corrigendum [Word and LaTeX templates](#).

If the error was introduced during the publishing process, contact the [Frontiers Production Office](#) to issue an erratum.

- Commentaries on Articles

For General Commentaries, the title of your manuscript must have the following format: "Commentary: Title of the original article". At the beginning of your Commentary, please provide the citation of the article commented on. Authors commenting on a Frontiers article must submit their commentary for consideration to the same Journal and Specialty as the original article.

Rebuttals may be submitted in response to Commentaries; our limit in place is one commentary and one response. Rebuttals should be submitted as General Commentary articles and the title should have the following format: "Response to: Commentary: Title of the original article".

- Focused Reviews

For Tier 2 invited **Focused Reviews**, to shape the paper on the importance of the research to the field, we recommend structuring the Review to discuss the paper's Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. In addition the authors must submit a

short biography of the corresponding author(s). This short biography has a maximum of 600 characters, including spaces.

A picture (5 x 5 cm, in *.tif or *.jpg, min 300 dpi) must be submitted along with the biography in the manuscript and separately during figure upload.

Focused Reviews highlight and explain key concepts of your work. Please highlight a minimum of four and a maximum of ten key concepts in bold in your manuscript and provide the definitions/explanations at the end of your manuscript under “Key Concepts”. Each definition has a maximum of 400 characters, including spaces.

-
- Systematic Reviews

For Systematic Reviews, the following article structure applies.

- Title: include systematic review/meta-synthesis/meta-analysis as appropriate in the title

Each of the sections should include specific sub-sections as follows

- Abstract
 - Background
 - Methods
 - Results
 - Conclusions
- Introduction
 - Rationale
 - Objectives
 - Research question
- Methods
 - Study design
 - Participants, interventions, comparators
 - Systematic review protocol
 - Search strategy
 - Data sources, studies sections and data extraction
 - Data analysis
- Results
 - Provide a flow diagram of the studies retrieved for the review
 - Study selection and characteristics
 - Synthesized findings
 - Risk of bias
- Discussion
 - Summary of main findings
 - Limitations

- Conclusions
-
- Data Reports

For Data Reports, please make sure to follow these additional specific guidelines.

1. The data sets (defined as a collection of data that contains individual data units organized in a standardized reusable format, including pre-processed or raw data) must be deposited in a public repository for long-term data preservation prior to submission of the Data Report. The data set(s) is to be fixed and made publicly available upon publication of the Data Report.

2. Our data sharing policy also requires that the dataset be made available to the Frontiers editors and reviewers during the review process of the manuscript. Prior to submission of your Data Report manuscript, please ensure that the repository you have selected supports confidential peer-review. If it does not, we recommend that the authors deposit the datasets to figshare or Dryad Digital Repository for the peer-review process. The data set(s) can then be transferred to another relevant repository before final publication, should the article be accepted for publication at Frontiers.

Note that it is the authors' responsibility to maintain the data sets after publication of the Data Report. Any published Frontiers Data Report article will be considered for retraction should the data be removed from the final selected repository after publication or the access become restricted.

3. The submitted manuscript must include the following details:

- Detailed cover letter (including a link to the data set)
- Name of the data set
- Name of the database/repository where the data set has been submitted
- Link to the data set for confidential peer-review (which must be updated to a full data citation and added to the reference list prior to publication)
- Description of how the data was acquired, data collection period
- Filters applied to the data
- Overview of the data files and their formats
- Reference to and/or description of the protocols or methods used to collect the data
- Information on how readers may interpret the data set and reuse the data

All these elements will be peer-reviewed and are required for the publication of the Data Report.

Any future updates to the data set(s) should be deposited as independent versions in a repository and the relevant information may be published as General Commentaries linked on the Frontiers website to the initial Data Report.

Any detailed analyses or new scientific insights relating to the Data Report can be submitted as independent research articles which can also be linked on the Frontiers

website to the Data Report article. The protocols and methodology used to collect the data can also be submitted as Methods articles.

-
- Case Reports

For Case Reports the following sections are mandatory:

1. Introduction

Include symptoms at presentation, physical exams and lab results.

2. Background

This section may be divided by subheadings. Include history and review of similar cases.

3. Discussion

This section may be divided by subheadings. Include diagnosis and treatment.

4. Concluding Remarks

-
- Policy Briefs

For Policy Briefs, the following article structure applies:

- Abstract (bullet point format)
- Introduction
- Sections on Policy Options and Implications
- Section on Actionable Recommendations
- Conclusions

-
- Protocols

For Protocols articles, please make sure to follow these additional specific guidelines.

0. The submitted manuscript must include the following sections:

1. An Abstract
2. An Introduction outlining the protocol and summarizing its possible applications.
3. A Materials and Equipment section providing a list of reagents or other materials and/or equipment required to carry out the protocol. For basic-science protocols, the formulation of any solutions, e.g. buffers, should be clearly indicated in the Materials and Equipment section.

4. A Stepwise Procedures section listing, stepwise, the stages of the protocol. The timing of each step or related series of steps should be indicated, as should points at which it is possible to pause or halt the procedure without adversely influencing the outcome. For steps requiring repeated measurements, details of precision and accuracy should be presented. Limits of detection or quantification should also be stipulated where appropriate.

5. An Anticipated Results section describing, and illustrating with figures, where possible, the expected outcome of the protocol. Any analytical software or methods should be presented in detail in this section, as should possible pitfalls and artifacts of the procedure and any troubleshooting measures to counteract them. These last may also be described in an optional Notes section.

6. Code or training data sets referenced by the protocol and useful in its execution should be hosted in an online repository; their accession numbers or other stable identifiers should be referenced in the Anticipated Results.

1. The following additional information should be presented in the cover letter accompanying your manuscript:

- Significance of the protocol and references to any relevant primary research manuscript(s) in which it has been previously employed.
- Any advance represented by the method compared with other, similar methods.
- Appropriateness of the manuscript to the Specialty Section to which it has been submitted.
- Associate Editors with suitable expertise to handle the manuscript.
-
- Code

The code should be novel and presented in human-readable format, adhere to the standard conventions of the language used (variable names, indentation, style and grammar), be well documented (comments in source), be provided with an example data set to show efficacy, be compilable or executable free of errors (stating configuration of system used).

The code should only call standard (freely accessible) libraries or include required libraries, and include a detailed description of the use-scenarios, expected outcomes from the code and known limitations of the code.

Please therefore make sure to provide access to the following upon submission:

0. Abstract explicitly including the language of code
1. Keywords including the language of the code in the following format: "code:language" e.g.: "code:matlab"
2. Cover Letter including the utility of the code and its language

3. Main Text including:

- code description
- application and utility of the code
- link to an accessible online code repository where the most recent source code version is stored and curated (with an associated DOI for retrieval after review)
- access to test data and readme files
- methods used
- example of use
- known issues
- licensing information (Open Source licenses recommended)

4. Compressed Archive (.zip) of the reviewed version of the code as supplementary material (.zip archives are currently available under the “Presentation” dropdown menu).

-
- Cover Letter

When you submit your manuscript, you will be required to add a cover letter directed to the Editor.

Please indicate, in the first paragraph, the title of the manuscript, the article type, the Journal and specialty to which the manuscript is being submitted, and whether it is part of a Research Topic. You must also state that the manuscript has not been submitted for publication elsewhere; any closely related works submitted for consideration in other publications should be noted and you may be asked to provide a copy.

It is essential as well that you provide a short description of the significance of the manuscript. While Frontiers evaluates articles using objective criteria, rather than impact or novelty, your cover letter should frame the question(s) you have addressed in your work in the context of the current body of knowledge, providing evidence that the findings - whether positive or negative - contribute to progress in your research discipline. This will assist the Chief Editors to determine whether your manuscript fits within the scope of a specialty as defined in its mission statement; a detailed cover letter will also facilitate the identification of the Editors and Reviewers most appropriate to evaluate your work, ultimately expediting your manuscript's initial consideration.

- Studies involving human subjects

Frontiers endorses the [Helsinki declaration](#) and the [guidelines](#) of the International Committee of Medical Journal Editors. Studies involving human participants must be performed in accordance with relevant institutional and national guidelines, with the appropriate institutional ethics committee's approval and informed written consent from all

human subjects involved in the study. For manuscripts reporting studies involving human subjects, authors must clearly state the relevant ethics committee approving the study and confirm that study subjects have granted their written informed consent. Manuscripts reporting clinical trial data need to include the name of the public registry under which the clinical trial has been registered, and the number of the trial. For most article types, the information should appear in the Materials and Methods section.

For example: *This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee' with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.*

Should the study be exempt from this requirement, authors need to clearly state the reasons in the cover letter and manuscript. For incompetent patients (e.g. young children, unconscious patients) some form of consent, such as from family members, is needed.

-
- Studies involving animal research

All experiments reporting results on animal research must be performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations. In the manuscript, authors must identify the full name of the ethics committee that approved the work. For most article types, this statement should appear in the Materials and Methods section.

For example: *This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee'. The protocol was approved by the 'name of committee'.*

Should the study be exempt from this requirement, authors need to clearly state the reasons in the cover letter and manuscript.

Studies involving privately owned animals should demonstrate the best practice veterinary care and confirm that informed consent has been granted by the owner/s, or the legal representative of the owner/s.

-
- Clinical Trial Registration

The [World Health Organization](#) defines clinical trial as "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes." In accordance with the Clinical Trial Registration Statement from the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\)](#), all clinical trials must be registered in a public trials registry at or before the onset of participant enrollment. This requirement applies to all clinical trials that begin enrollment after July 1, 2005. To meet the requirements of the ICMJE, clinical trials can be registered with any [Primary Registry in the WHO Registry Network](#) or an [ICMJE approved registry](#).

Clinical trial reports should be compliant with the [Consolidated Standards of Reporting Trials \(CONSORT\)](#) both in terms of including a flow diagram presenting the enrollment, intervention allocation, follow-up, and data analysis with number of subjects for each and

taking into account the CONSORT Checklist of items to include when reporting a randomized clinical trial.

The information on the clinical trial registration (Unique Identifier and URL) must be included in the [abstract](#).

- Materials and Data policies

Frontiers supports the [Transparency and Openness Promotion \(TOP\) guidelines](#), which state that materials, data, and code described in published works should be made available, without undue reservation, to any qualified researcher, to expedite work that builds on previous findings and enhance the reproducibility of the scientific record.

To comply with these guidelines and encourage best practice in methods reporting, Frontiers requires that all research materials be clearly indicated in Materials and Methods sections with sufficient detail to the reader to enable the reproduction of an experiment. Authors wishing to participate in the [Resource Identification Initiative](#) should cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases, and services using the corresponding catalog number and RRID in your current manuscript. For more information about the project and for steps on how to search for an RRID, please click [here](#).

Frontiers also asks that authors make their data available to editor and reviewers during peer-review to enable complete and objective evaluation of the work described. To comply with best practice in their field of research, authors must also make certain types of data available to readers at time of publication in stable, community-supported repositories such as those listed below, unless in case of serious confidentiality concerns (for example, research involving human subjects). Although not mandatory, authors may also consider the deposition of additional data-types (see below). Authors are encouraged to contact their respective journal's editorial office prior to submission with any queries concerning data reporting.

Authors are required to deposit the following data-types in public, community-supported repositories, such as those listed below, prior to publication of an associated Frontiers manuscript:

Data-type	Recommended Repositories	Metadata Standard
Genetic and genomic sequence (DNA/ RNA)^	GenBank DNA Data Bank of Japan (DDBJ) European Nucleotide Archive (ENA)	MiXS
Metagenomic sequence	EBI Metagenomics	MiXS

DNA and RNA trace or short-read sequencing data	NCBI Trace Archive NCBI Sequence Read Archive	MiXS
Genetic polymorphism data, including SNP and CNV data	dbSNP dbVar European Variation Archive DGVa	MiXS
Gene expression data; chromatin immunoprecipitation data (deep-sequencing or microarray)	ArrayExpress Gene Expression Omnibus (GEO)	MIAME / MINSEQE
Data linking genotype to phenotype	dbGaP	
Protein sequence data	UniProt	
Proteome profiling data	PRIDE PeptideAtlas ProteomeXchange	MIAPE
Small molecule, protein, protein complex data structural data	Crystallography Open Database Cambridge Structural Database wwPDB (Protein DataBank) Electron Microscopy Databank	CIF
Taxonomy data	Zoobank	

^ Genetic sequence variants should be annotated according to the guidelines established by the [Human Variome Project](#).

Authors are encouraged to consider deposition in public, community-supported repositories of the data-types listed below:

Data-type

Recommended

Metadata

	Repositories	Standard
Protein-protein interaction data	Database of Interacting Proteins (DIP)	MIMIx
Metabolite and metabolome profiling data	MetaboLights Human Metabolome Database	MSI
Small-molecule screening data, chemical compound data	PubChem	CIF
Flow cytometry data	Flow Repository	
Brain Imaging data / Neuroimaging data	OpenfMRI INDI NITRC NeuroVault [Statistical maps]	
Trait data	TRY database	
Phenology data	National Phenology Network	
Any data	FigShare Dryad Repository	Digital None

Inclusion of Zoological Nomenclature

The International Code of Zoological Nomenclature, in a recent 2012 amendment to the [1999 Zoological Code](#), allows all electronic-only papers, such as those published by the Frontiers journals, to have valid new taxon names and nomenclatural acts. However, these new names or nomenclatural acts must be registered in [ZOOBANK](#) and have associated Life Science Identifiers (LSIDs). Registration must be done by the authors before publication. Should your manuscript include any zoological new taxon names and/or nomenclatural acts, please ensure that they are registered prior to final publication.

>Inclusion of RNAseq Data

Studies employing RNAseq for comparative transcriptomic analyses must contain at least 3 biological replicates (unless otherwise justified). Each biological replicate should be represented in an independent library, each with a unique barcode if libraries are

multiplexed for sequencing. Validation on a number of key transcripts highlighted in the study is also highly recommended.

Full data accompanying these experiments must be made available to reviewers at the time of submission in a freely accessible resource e.g. the [sequence read archive \(SRA\)](#) or [European Nucleotide Archive \(ENA\)](#). Depending on the question addressed in a manuscript, de novo assemblies of transcriptomes may also require multiple replicates and assembled sequences together with sequence annotation must be made freely available e.g. [figshare](#) or [dryad](#).

Inclusion of Proteomics Data

Authors should provide relevant information relating to how peptide/protein matches were undertaken, including methods used to process and analyze data, false discovery rates (FDR) for large-scale studies, and threshold or cut-off rates for peptide and protein matches. Further information should include software used, mass spectrometer type, sequence database and version, number of sequences in database, processing methods, mass tolerances used for matching, variable/fixed modifications, allowable missed cleavages, etc.

Authors should provide as supplementary material information used to identify proteins and/or peptides. This should include information such as accession numbers, observed mass (m/z), charge, delta mass, matched mass, peptide/protein scores, peptide modification, miscleavages, peptide sequence, match rank, matched species (for cross-species matching), number of peptide matches, etc. Ambiguous protein/peptide matches should be indicated.

For quantitative proteomics analyses, authors should provide information to justify the statistical significance, including biological replicates, statistical methods, estimates of uncertainty, and the methods used for calculating error.

For peptide matches with biologically relevant post-translational modifications (PTMs) and for any protein match that has occurred using a single mass spectrum, authors should include this information as raw data or annotated spectra, or submit data to an online repository (recommended option; see table below).

Raw or matched data and 2-DE images should be submitted to public proteomics repositories such as those participating in ProteomeXchange. Submission codes and/or links to data should be provided within the manuscript.

4. Figure and Table Guidelines

- General Style Guidelines for Figures

The maximum number of figures and tables for all article types are shown in the [Summary Table](#). Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the manuscript, the figures will then be automatically embedded at the end of

the submitted manuscript. Kindly ensure that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order.

For graphs, there must be a self-explanatory label (including units) along each axis. For figures with more than one panel, panels should be clearly indicated using labels (A), (B), (C), (D), etc. However, do not embed the part labels over any part of the image, these labels will be added during typesetting according to Frontiers journal style. Please note that figures which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process.

Permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, to follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

Frontiers takes concerns regarding image manipulation seriously. We request that no individual features within an image are modified (eg. enhanced, obscured, moved, removed or added). Where images are grouped together, for example, parts of gels are lined up, this must be clearly explained in the figure or in the figure text, and the original entire gel should be submitted as supplementary material. Any change in brightness, contrast or color balance must be applied to every pixel in the image and the changes should not alter the information illustrated in the figure. Any concerns raised will be investigated and the authors will be asked to provide the original images.

- General Style Guidelines for Tables

Tables should be inserted at the end of the manuscript. If you use a word processor, build your table in word. If you use a LaTeX processor, build your table in LaTeX. An empty line should be left before and after the table.

Please note that large tables covering several pages cannot be included in the final PDF for formatting reasons. These tables will be published as supplementary material on the online article abstract page at the time of acceptance. The author will notified during the typesetting of the final article if this is the case. A link in the final PDF will direct to the online material.

-
- Figure and Table Legends

Figure and table legends are required to have the same font as the main text (12 point normal Times New Roman, single spaced). Legends should be preceded by the appropriate label, for example "Figure 1" or "Table 4". Figure legends should be placed at the end of the manuscript (for supplementary images you must include the caption with the figure, uploaded as a separate file). Table legends must be placed immediately before the table. Please use only a single paragraph for the legend. Figure panels are referred to by bold capital letters in brackets: (A), (B), (C), (D), etc.

- Image Size

Figure images should be prepared with the PDF layout in mind, individual figures should not be longer than one page and with a width that corresponds to 1 column or 2 columns.

- **All articles are prepared using the 2 column layout:** 2 column articles can contain images 85 mm or 180 mm wide.

- **Format**

The following formats are accepted:
 TIFF (.tif) TIFF files should be saved using LZW compression or any other non-lossy compression method.
 JPEG (.jpg)
 EPS (.eps) EPS files can be uploaded upon acceptance

- **Color Image Mode**

Images must be submitted in the color mode RGB.

- **Resolution Requirements**

All images must be uploaded separately in the submission procedure and have a resolution of **300 dpi at final size**. Check the resolution of your figure by enlarging it to 150%. If the resolution is too low, the image will appear blurry, jagged or have a stair-stepped effect.

Please note saving a figure directly as an image file (JPEG, TIF) can greatly affect the resolution of your image. To avoid this, one option is to export the file as PDF, then convert into TIFF or EPS using a graphics software. EPS files can be uploaded upon acceptance.

- **Chemical Structures**

Chemical structures should be prepared using ChemDraw or a similar program according to the guidelines given below:

Drawing settings: chain angle, 120° bond spacing, 18% of width; fixed length, 14.4 pt; bold width, 2.0 pt; line width, 0.6 pt; margin width 1.6 pt; hash spacing 2.5 pt. Scale 100% Atom Label settings: font, Arial; size, 8 pt.

Assign all chemical compounds a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text. Figures containing chemical structures should be submitted in a size appropriate for incorporation into the manuscript.

- **Legibility**

Figures must be legible. Check the following:

- The smallest visible text is no less than 8 points in height, when viewed at actual size.

- Solid lines are not broken up.
- Image areas are not pixilated or stair stepped.
- Text is legible and of high quality.
- Any lines in the graphic are no smaller than 2 points width.