UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARAHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CINAMALDEÍDO NA SEPSE INDUZIDA POR *Escherichia coli* PRODUTORA DA SERINOPROTEASE Pic

ISABELLA FERNANDES DA SILVA FIGUEIREDO

São Luís

2020

ISABELLA FERNANDES DA SILVA FIGUEIREDO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CINAMALDEÍDO NA SEPSE INDUZIDA POR *Escherichia coli* PRODUTORA DA SERINOPROTEASE Pic

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

Orientador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

São Luís

2020

ISABELLA FERNANDES DA SILVA FIGUEIREDO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CINAMALDEÍDO NA SEPSE INDUZIDA POR *Escherichia coli* PRODUTORA DA SERINOPROTEASE Pic

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

Aprovada em _____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dr. Ludmila Bezerra da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Julliana Ribeiro Alves dos Santos
Universidade CEUMA

“E conhecereis a verdade e a verdade vos libertará.”

João 8:32

Dedico
Ao meu esposo e aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao único que é digno de receber a honra e a glória, a força e o poder, ao rei eterno e imortal, invisível, mas real. Coroamos a ti, ó rei JESUS!

À minha família: meu esposo, **Moisés Serejo**, meu fiel companheiro, obrigada por todo apoio e amor; meu Pai, **Carlos Figueiredo**, exemplo de seriedade, honestidade, respeito e profissionalismo; minha mãe, **Vânia Figueiredo**, companheira, que sempre sonhou os meus sonhos e que nunca desistiu de acreditar em mim; e minha irmã**, Isadora Figueiredo**, pela parceria em todos os momentos da minha vida. Eu amo vocês demais!

Ao meu orientador, **Prof. Afonso Abreu**, obrigada pelas oportunidades a mim concedidas, pelos conselhos, preocupação e palavras de incentivo. És admirável, por seu profissionalismo e inteligência. Obrigada pela paciência em todos os momentos e pela hombridade na orientação deste trabalho. Meu muito obrigada!

À família LEPat, em especial Itaynara, Raissa, Savana, Jhonatan, Lorena, Arthur, Carlos, Thalita e a todos os colegas de trabalho do laboratório pelas conversas e motivação.

Às minhas alunas de Iniciação Cientifica (Sammy, Fabrícia, Mariana, Suzy e Carol), obrigada meninas, vocês foram chaves para a realização deste trabalho.

À família do Laboratório de Patogenicidade Microbiana (LAPMIC) do CEUMA por todo apoio técnico operacional e instruções científicas. Muito obrigada pelo acolhimento e auxilio.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da UFMA por todo apoio técnico operacional e instruções científicas, em especial à pessoa da Professora Flávia Nascimento e do Jhonny, pela parceria.

Aos amigos que conquistei neste mestrado, em especial aqueles com quem convivi mais de perto (Diego Charles, Patrícia e Nilson) pela amizade e parceria durante este tempo.

Aos funcionários do biotério da Universidade Ceuma, em especial Sr. Edson e Socorro pelo apoio e disposição em ajudar durante essa jornada.

À CAPES pela bolsa de iniciação científica concedida e ao CNPq e FAPEMA pelo financiamento do projeto.

À Universidade Ceuma, por disponibilizar toda a estrutura e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

RESUMO

Define-se sepse como presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo à infecção. Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que uma *Escherichia coli* produtora da serinoprotease Pic foi responsável por induzir a sepse letal em camundongos, causando morte dos mesmos em até 12 h. Diversos produtos de origem natural têm sido investigados quanto ao seu potencial bactericida, dentre estes, o cinamaldeído. Este produto, é um álcool terpeno cíclico que possui várias atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana de amplo espectro, antioxidante e anti-apoptótico. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade do cinamaldeído em animais submetidos à sepse induzida por *E. coli* produtora de Pic. Para isto foi utilizada a cepa E. *coli* F5 para avaliação do efeito bactericida. A mesma foi incubada com o cinamaldeído em concentrações que variaram de 0.2 a 25 mg/mL em placa de 96 poços. Para a avaliação do efeito citotóxico, o composto foi incubado com células Vero por um período de 48 h e foi adicionado 100 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), as placas foram incubadas por 3 h a 37º C e 5% de CO_2. Foi realizado um ensaio de sobrevida com camundongos da linhagem Swiss, os quais foram divididos em 7 grupos: (1) PBS, (2) Cinamaldeído, (3) *E.coli* F5 (grupos controles), (4,5) os Grupos Profiláticos que recebeu o composto em estudo durante 5 dias nas concentrações de (30mg/kg e 60mg/kg, respectivamente) e após os 5 dias foram infectados para observar o efeito profilático do cinamaldeído e por último , (6,7) os Grupos Tratados com cinamaldeído os quais, primeiramente, os animais foram infectados e após 2h da infecção receberam o cinamaldeído nas concentrações de (30mg/kg e 60mg/kg, respectivamente). Após a análise da sobrevida, os grupos: PBS, Cinamaldeído, *E.coli* F5 e o Grupo Tratado com cinamaldeído na dose de 60mg/kg foram submetidos a coleta de amostras tais como: sangue, lavado peritoneal e órgãos (pulmão, fígado, baço e rim). Foi possível determinar nos ensaios *in vitro,* que o cinamaldeído na concentração de 6mg/mL inibiu o crescimento bacteriano. No ensaio de citotoxicidade, o cinamaldeído em nenhuma das concentrações utilizadas apresentou toxicidade para as células Vero. Já nos ensaios *in vivo,* o ensaio de sobrevida mostrou que o cinamaldeído, nas concentrações de 60mg/kg, conseguiu manter 33% dos camundongos vivos após a infecção. Na quantificação de citocinas no soro e no lavado peritoneal, observou-se uma diminuição significativa de citocinas pró e anti-inflamatórias dos animais infectados e tratados com cinamaldeído 60 mg/kg quando comparados com os grupos controles. Foi evidenciado a diminuição de óxido nítrico de forma relevante em animais sépticos tratados com cinamaldeído 60 mg/kg quando comparados com os grupos controle. Houve no Grupo Tratado a diminuição/manutenção de alguns tipos celulares como linfócitos no local da infeção, mas já no lavado peritoneal observamos apenas o aumento na produção celular das células totais. Além disso, o composto induziu um aumento na produção de células da medula óssea. O cinamaldeído na concentração de 60mg/kg não apresentou efeito bactericida em modelo animal. Concluímos então, que a dose de cinamaldeído (60mg/kg) consegue manter a sobrevida de 33% dos animais com sepse induzida pela inoculação i.p. de *E. coli* produtora da serinoprotease Pic. Além disso, é evidente no presente trabalho que o CNA demonstrou possíveis potenciais anti-inflamatórios e imunomoduladores que podem ajudar a controlar e equilibrar esses eventos na sepse.

Palavras chaves: Sepse; *Escherichia coli*; Pic; Cinamaldeído.

ABSTRACT

Sepsis is defined as the presence of life-threatening organ dysfunction secondary to the organism's unregulated response to infection. Recently, our group showed that Pic producing-*Escherichia coli* was responsible for inducing lethal sepsis in mice, causing death within 12 h. Several natural products have been investigated for their bactericidal potential, among these, cinnamaldehyde. The cinnamaldehyde (cinnamic aldehyde or 3-phenyl-2-propenal) is a cyclic terpene alcohol with several biological activities, including antimicrobial activity, antioxidants and anti-apoptotic. Therefore, the aim of this study is to evaluate the activity of cinnamaldehyde in the treatment of animals submitted to sepsis by Pic producing-*E. coli*. For this, the *E. coli* F5 was used to evaluate the bactericidal effect. It was incubated with cinnamaldehyde in concentrations ranging from 0.2 to 25 mg/mL, using 96-well plates. Then, they were incubated at 37º for 24 h and after this period Resazurin (0.03%) was used to determine the minimum inhibitory concentration. To evaluate a possible cytotoxic effect, cinnamaldehyde at various concentrations was incubated with Vero cells for 48 h. A total of 100 µL of MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added and plates incubated for 3 h at 37 °C and 5% CO_2. After, Swiss mice from four to eight-week-old weighing on average 25 g were used to evaluate the survival. The animal (n = 6 animals / group) were divided in groups: PBS, Cinnamaldehyde, *E. coli* F5, prophylactic group and treated group (after infection with *E. coli* F5). The treated and prophylactic groups received distinct concentrations of cinnamaldehyde (30mg / kg and 60 mg/kg). It was possible to determine that cinnamaldehyde at 6 mg/mL inhibited bacterial growth. In the cytotoxicity assay, none of the cinnamaldehyde concentrations showed toxicity to Vero cells. The survival trial showed that cinnamaldehyde at 60 mg/kg was able to keep 33% of mice alive after infection. In addition, it is evident in the present study that the CNA demonstrates potential anti-inflammatory actions and immunomodulators that can help control and balance these sepsis events. The decrease / maintenance of some cell types such as lymphocytes at the infection site, the reduction of NO, and the regulation of some cytokines can contribute positively to the control of this syndrome.

Keywords: *Escherichia coli*; Sepsis; Pic; Cinnamaldehyde.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CBA	*Cytometric Bead Array*
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
CNA	Cinamaldeído
COX	Cicloxigenase
DAEC	*Escherichia coli* que adere difusamente
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DEC	*Escherichia coli* diarreiogênicas
DIC	Coagulação intravascular disseminada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	*Escherichia coli* enteroagregativa
EIEC	*Escherichia coli* enteroinvasora
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPEC	*Escherichia coli* enteropatogênica
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC	*Escherichia coli* extra-intestinal
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
ip.	Intraperitoneal
iKB	Inibidor do fator Kappa B
IL	Interleucina

IFN	Interferon
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de ataque à membrana
MC	MacConkey
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MRSA	Staphylococcus Aureus Resistente à Meticilina
NaOH	Hidróxido de Sódio
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-kB	Fator nuclear kB
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução tamponada com fosfato
Pic	Proteína envolvida na colonização
PMN	Células Polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment
SOFA	*Sequential Organ Failure Assessment*
SPATE	*Serino protease autotransportadora de Enterobacteriaceae*
STEC	*Escherichia coli* produtora da toxina Shiga
TGF	Fator de Transformação do Crescimento
TLR	Receptores tipo toll
TNF	Fator de necrose tumoral

UFC	Unidade formadora de colônia
UPEC	*Escherichia coli* uropatogênica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os critérios clínicos para diagnóstico de sepse e choque séptico na antiga definição e na atual.....17

Tabela 2. Tabela de diagnóstico para a sepse (Parâmetros laboratoriais) Uso da tabela do Escore SOFA 18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais mecanismos de disfunção orgânica..... 24

Figura 2. Estrutura geral das proteínas autotransportadoras.....28

Figura 3. Fórmula estrutural do cinamaldeído.....31

Figura 4. Ensaio de Citotoxidade sobre célula Vero com MTT que marca a viabilidade celular através da atividade mitocondrial.....50

Figura 5. Avaliação da sobrevida dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de *Escherichia coli* produtora da serinoprotease Pic pré-tratados com cinamaldeído.....51

Figura 6. Avaliação da sobrevida dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de *Escherichia coli* produtora da serinoprotease Pic pós-tratados com cinamaldeído.....52

Figura 7. Contagem total e diferencial das células sanguíneas dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle.....53

Figura 8. Contagem do número total de células do baço dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle.....54

Figura 9. Contagem do número total de células da medula óssea dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controles.....55

Figura 10. Produção de Óxido Nítrico no sangue dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e de animais controles.....56

Figura 11. Concentração de citocinas no soro dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle.....57

Figura 12. Concentração de citocinas no lavado peritoneal dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle.....58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

2 REFERENCIAL TEÓRICO 16

2.1. Sepse: Conceito e Epidemiologia 16

2.2. Aspectos imunológicos da Sepse 20

2.3. Fisiopatologia da sepse 21

2.4. Modelos Experimentais de Sepse 24

2.5. *Escherichia coli* 26

2.6. Proteína envolvida na colonização (Pic) 27

2.7. Usos e potencial terapêuticos da Canela 30

2.8. Cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal) 31

3. OBJETIVO 34

3.1. Objetivo geral 34

3.2. Objetivos específicos 34

4. CAPÍTULO I. O Cinamaldeído aumenta a sobrevida de animais com sepse ao induzir uma imunomodulação da resposta do hospedeiro 35

Resultados 41

Discussão 43

5. Considerações Finais 61

6. CONCLUSÕES 62

REFERÊNCIAS 63

ANEXOS 73

1. INTRODUÇÃO

A sepse é caracterizada por uma disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo a uma infecção (SINGER et al, 2016), representando um grave problema de saúde pública mundial, devido a sua alta taxa de mortalidade e em razão do seu difícil e oneroso tratamento (MIQUELIN; REIS, 2016; RULIM et al., 2017).

Nas últimas décadas, a sepse tem recebido atenção por ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva com opções terapêuticas limitadas (HUTTUNEN, AITTONIEMI, 2011; CHALUPKA; TALMOR, 2012). Estima-se que a incidência tenha um aumento de 13% por ano e a taxa de letalidade é cerca de 50%. Com o diagnóstico precoce e tratamento emergencial padronizado é possível reduzir substancialmente o índice de mortalidade por sepse (FREITAS et al., 2016).

Recentemente, ao estudar a influência de uma *Escherichia coli* produtora da serinoprotease Pic no processo de sepse, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a bactéria foi responsável por induzir a sepse letal em camundongos da linhagem Swiss, causando morte dos mesmos em até 12 h com aumento elevado de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Ao mesmo tempo, o mutante no gene *pic* não induziu aumento de mediadores e não foi capaz de induzir morte dos animais (DUTRA, et al. 2020).

Já foram descritos vários papéis biológicos para Pic, incluindo hemaglutinação, atividade mucinolítica, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem de glicoproteínas de superfície de leucócitos, que estão envolvidas no tráfico, migração e inflamação (RUIZ-PEREZ et al., 2011; HENDERSON et al., 1999). Além disso, promove a colonização intestinal de ratos e coelhos pela clivagem do muco presente na luz intestinal, favorecendo assim a adesão da bactéria aos enterócitos (ABREU et al., 2016; MUNERA et al., 2014; HARRINGTON et al., 2009), bem como capacidade de clivar diversas moléculas do Sistema complemento (ABREU et al., 2015).

Sabe-se, que o pacote de tratamento da sepse aborda um conjunto selecionado de elementos de cuidado que, quando implementados como um grupo, afetam os desfechos clínicos, simplificando os processos complexos de atendimento a esses pacientes. LEVY et al., 2018). Neste pacote está incluído, majoritariamente: Medir as concentrações séricas de lactato; Obter hemoculturas antes de iniciar antibióticos; Iniciar antibióticos de amplo espectro; Fazer ressuscitação volêmica com 30 mL/kg de cristaloide para hipotensão ou lactato maior ou igual

a 4 mmol/L. Iniciar terapia vasopressora se o paciente apresentar hipotensão durante ou após a ressuscitação volêmica, para manter a pressão arterial média maior que 65 mmHg (CÁRNIO, et al., 2019)

Baseado em todas essas características de Pic e também na busca de intervenções mais especificas para o processo de sepse, faz-se necessário o estudo de determinados compostos, bem como investigar a ação dos mesmos sobe bactérias produtoras desta serinoprotease.

É sabido que plantas ou seus produtos derivados (extratos, óleos, infusões, etc.) têm sido usados para tratar infecções e isso é uma prática antiga em muitas partes do mundo, especialmente em países emergentes como o Brasil onde a medicina popular é muito utilizada para variedade de doenças (DO NASCIMENTO et al., 2013). Essas matérias-primas aparentemente têm uma menor toxicidade ao serem comparadas com as drogas sintéticas, o que as torna candidatos atraentes para o desenvolvimento de novas drogas (MENDES, 2015).

O cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal), um álcool terpeno cíclico, é o principal componente ativo do óleo essencial de canela (60-75%). Possui diversas funções já comprovadas: tem sido amplamente utilizado em goma, sorvete, doces, bebidas, pães, cereais (LÓPEZ-MATA, 2017) e cosméticos (LEE; BALICK, 2005). Possuem várias atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana de amplo espectro, antioxidantes e antiapoptótico (SHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015; UTCHARIYAKIAT et al., 2016). Possui também, atividade cicatrizante (GILL et al., 2014). Pesquisas apontam que o óleo essencial da canela, foi considerado pouco tóxico para os seres humanos (SHEN, et al 2015).

Devido aos diversos relatos das propriedades farmacológicas do cinamaldeído, principal constituinte do óleo essencial da canela, o presente estudo teve como objetivo avaliar se há evidências de quaisquer efeitos antimicrobianos ou imunomoduladores desse composto no tratamento de camundongos com sepse induzida por *E. coli* produtora de Pic.

Este trabalho gerou um artigo (Capítulo I), que está em processo de submissão à revista Pharmaceuticals, Qualis A1, Fator de impacto 3.8 (ANEXO I).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Sepse: Conceito e Epidemiologia

Segundo o Consenso Internacional para a Definição de Sepse e Choque Séptico, a sepse é definida como a presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo frente à infecção (SINGER et al., 2016); e choque séptico como a sepse acentuada apresentando anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas associadas com maior risco de morte do que a sepse isoladamente (SHANKAR-HARI M et al., 2016).

Diante deste novo conceito, houve a exclusão da classificação de *sepse grave* como um diagnóstico, ficando apenas os termos *sepse* e *choque séptico*. Com isso, associa-se o termo "sepse" a uma condição grave, a fim de promover o melhor entendimento do assunto pelos profissionais de saúde e público em geral (RIBEIRO, et al, 2016).

O choque séptico, também empregado no contexto da sepse, refere-se a um subgrupo dos pacientes com sepse que apresentam acentuadas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas associadas com um risco de morte maior quando comparado à sepse isoladamente. O critério diagnóstico de choque séptico é a necessidade de vasopressor para manter uma pressão arterial média acima de 65 mmHg após a infusão adequada de fluidos, associada a nível sérico de lactato acima de 2 mmol/L (SHANKAR-HARI et al., 2016).

Sabe-se que esta síndrome tem alta prevalência de morbidade e mortalidade além de gerar altos custos para os serviços de saúde. Seu reconhecimento precoce e tratamento adequado são fatores primários para a mudança deste cenário. A implementação de protocolos clínicos gerenciados é uma ferramenta útil neste contexto, auxiliando as instituições na padronização do atendimento ao paciente séptico, diminuindo desfechos negativos e proporcionando melhor efetividade do tratamento (ILAS, 2018).

A Tabela 1 mostra os critérios clínicos para o diagnóstico, que acompanha as alterações dos novos conceitos.

Tabela 1: Comparação entre os critérios clínicos para diagnóstico de sepse e choque séptico na antiga definição e na atual.

	Sepsis- 2 – 2001	**Sepsis-3 – 2016**
Sepse	Suspeita de infecção + - temperatura < 36°C ou>38°C - frequência cardíaca > 90bpm - frequência respiratória > 20 mrm ou PaCO2 < 32mmHg - leucócitos totais < 4000 ou > 12000; ou > 10% de bastões	Suspeita/Documentação de infecção + Aumento de 2 ou mais SOFA
Sepse grave	Sepse + - Débito Urinário < 0.5ml/Kg/h por 2h - Creatinina > 2.0 mg/dL - Plaquetas < 100.000 - SaO2 < 90% em ar ambiente - PAS < 90 ou PAM < 65 - Lactato > 2 mmol/L - RNI > 1.5 ou KTTP > 60s - Bilirrubina > 2.0 mg/dL	Definição excluída
Choque Séptico	Sepse + Hipotensão mesmo com reanimação volêmica adequada	Sepse + - Necessidade de vasopressores para manter PAM > 65 - Lactato > 2mmol/L após reanimação volêmica adequada

Abreviações: bpm, Batimentos por Minuto; $PaCO_2$, Pressão Parcial de CO_2; SOFA, *Sequential Organ Failure Assessment;* SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrome;* SaO_2, Saturação de oxigênio; PAS, Pressão Arterial Sistólica; PAM, Pressão Arterial Media; RNI, Razão Normalizada Internacional; KTTP, Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada.

Fonte: Braz. J. Hea. Rev., Curitiba, v. 2, n. 2, p. 6, 1294-1312, mar./apr. 2019.
(Adaptado de: ISAEM - International Student Association of Emergency Medicine, 2016).

Através da exclusão do conceito de *sepse grave* foi implementado o *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) para que uma maior importância à disfunção orgânica do paciente fosse feita. Dessa maneira, o paciente é diagnosticado com sepse quando há uma variação de dois ou mais pontos no *score* representado na Tabela 2.

Tabela 2: Escore SOFA

	Score				
Sistema	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
Respiração					
Pao_2/Fio_2,mm Hg(kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) com Suporte respiratório	<100 (13.5) com Suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, $x10^3/\mu L$	≥150	<150	<100	<50	<20
Fígado					
Bilirrubina, mg/dL (µmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	MAP≥70mm Hg	MAP<70mm Hg	Dopamina <5 ou Dobutamina (Qualquer dose)	Dopamina 5.1-15 ouEpinefrina ≤0.1 ouNorepinefrina ≤0.1	Dopamina >15 ou Epinefrina>0.1 ouNorepinefrina>0.1
SNC					
Escala de Coma de Glaslow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina, mg/dL (µmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Débito urinário mL/d				<500	<200

Fonte: Adaptado de Singer et al., 2016.

Abreviações: FIO2, fração inspirada de O2; PAM, pressão arterial média; PaO2, pressão parcial de O2.

Nos últimos 30 anos, a ocorrência mundial de sepse, cresceu em uma razão aproximada de 13,7% ao ano. São estimados anualmente, que mais de 18 milhões de pessoas sejam atingidas por sepse, e mais de 5 milhões vão a óbito (RUIZ, et al., 2016).

Em se tratando de um estudo global a letalidade hospitalar foi de 49,6%. No Brasil, a letalidade foi de 67,4%, comparável apenas com a taxa na Malásia (66,1%) e bem distante da letalidade de outros países (Alemanha – 43,4%, Argentina – 56,6%, Canadá – 50,4%, Índia – 39,0%, Estados Unidos – 42,9% e Austrália 32.6%). No entanto, deve-se ressaltar a diferença significativa de letalidade entre instituições públicas (58,5%) e privadas (34,5%) (Levy; Evans; Rhodes, 2018).

De acordo com o Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse (2015), o gasto hospitalar com cuidados aos pacientes com sepse grave ou choque séptico foi de U$ 10.595, com um gasto diário médio de U$ 1.028. De forma interessante, o custo diário de pacientes não sobreviventes foi persistentemente mais elevado, corroborando a ideia da associação entre gravidade e custos (ILAS, 2015).

A incidência no Brasil é de aproximadamente 200 mil casos por ano, com uma mortalidade entre 35 a 45% para sepse grave, e 52 a 65% para o choque séptico. Com a evolução de tratamentos mais agressivos e a melhora da sobrevida de pacientes com doenças crônicas e graves, observa-se maior tempo de hospitalização de pessoas portadoras dessas doenças e aumento da incidência de sepse (BARROS et al., 2016).

Parte dessa limitação se deve à falta de infraestrutura e número inadequado de profissionais para atendimento. Isso é provavelmente mais significativo nos atendimentos ligados ao SUS. No Brasil, o sistema privado de saúde é considerado de melhor nível, no que tange a infraestrutura e qualidade de gestão (ILAS, 2015).

No Maranhão, foram registradas cerca de 2 mil internações no ano de 2015, o que gerou um ônus de aproximadamente seis milhões de reais com o tratamento desses pacientes com septicemia, culminando em uma taxa de mortalidade de 42,18% (MIQUELIN; REIS, 2016). Porém, existe ainda uma grande necessidade de identificação dos diversos mecanismos envolvidos no desencadeamento desta síndrome. Assim, se faz necessário discutir os mecanismos imunológicos e os fatores envolvidos na fisiopatologia da sepse.

2.2. Aspectos imunológicos da Sepse

Diversos fatores estão implicados no desencadeamento e progressão da sepse, sendo a resposta imune do hospedeiro frente à infecção, um de seus fatores determinantes. A resposta imune responde à patógenos bacterianos, através de células residentes que iniciam o combate ao microrganismo e a resposta inflamatória. Células cuja função primordial é identificar, fagocitar e destruir esse patógeno incluem neutrófilos e macrófagos residentes ou atraídos para o sitio infeccioso (KUROSAWA et al., 2011).

O macrófago possui um papel determinante na sepse. Além de sua capacidade fagocítica no tecido e relevância como células apresentadoras de antígenos (APC), esta célula é capaz de produzir uma série de mediadores inflamatórios capazes de regular a dimensão da resposta inflamatória no tecido infectado. Estas células são capazes de apresentar fenótipos distintos caracterizados pela produção de grupos distintos de mediadores inflamatórios, chamado de polarização (MARIE et al., 2008).

Macrófagos com fenótipo M1 possuem potencial pró-inflamatório e são produtores de IL-1β, Fator de Necrose Tumoral (TNF), IL-6, enzima sintase induzida (NOSi) e NO. Macrófagos M2 por sua vez, estão associados a imunomodulação. Macrófagos M2 produzem fatores de crescimento, enzimas de remodelação da matriz extracelular que promovem reparação tecidual e citocinas anti-inflamatórias como o TGF-β e IL-10. O perfil M2 inclui pelo menos três subgrupos: M2a, induzido pela citocinas IL-4 ou IL-13; M2b, induzido pelos complexos imunes e agonistas de TLR4 ou receptores de IL-1 e M2c, induzido pela IL-10 e glicocorticoides (MARIE et al., 2008; FERNANDO, 2014).

Durante a infecção bacteriana ocorre a interação entre APCs e linfócitos. APCs são responsáveis por capturar antígenos microbianos e outros antígenos, apresentá-los aos linfócitos e fornecer sinais que estimulam a proliferação e diferenciação de células T. Dentre as principais APCs têm-se: células dendríticas, macrófagos e células B. Essas células são caracterizadas por ligar a imunidade inata à imunidade adquirida (KUROSAWA et al., 2011). Monócitos e macrófagos também são capazes de fagocitar bactérias (KUROSAWA et al., 2011).

Células imunes e inflamatórias migram também para o local da infecção e levam a alterações da microvasculatura e permeabilidade vascular e consequentemente, dano tecidual. Essas alterações ocorrem rapidamente em resposta à infecção e se não controladas, resultam em uma resposta inflamatória sistêmica caracterizada por falência de múltiplos órgãos, colapso da vasculatura, regulação térmica, e ocasionalmente, morte (CROUSER et al., 2008).

2.3. Fisiopatologia da sepse

A Fisiopatologia da sepse se dá através do mecanismo de defesa do organismo frente à resposta do hospedeiro quando há a presença de um agente agressor infeccioso. Diante desse contexto de infecção e resposta imunológica, vão ocorrer os fenômenos inflamatórios, que, nestes casos, incluem a ativação de citocinas, produção de óxido nítrico e dos radicais livres de oxigênio, bem como a expressão de moléculas de adesão no endotélio, além de outras alterações importantes nos processos de coagulação e fibrinólise (HOTCHKISS et al., 2009).

O sítio inflamatório ocasionado devido à infecção, através das células adicionais que são recrutadas para o sítio, libera mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, NO e espécies reativas de oxigênio (EROS), para auxiliar a erradicação dos patógenos invasores e em consequência disso ocorre o recrutamento de outras células (ANDRADES et al., 2011).

Dentre as células mais importantes durante as infecções, em geral, são os neutrófilos, que também são chamados polimorfonucleares (PMNs). Elas possuem propriedades antimicrobianas e produzem espécies reativas do oxigênio (EROS), sendo essas células as primeiras a migrarem para o sitio infeccioso (KUROSAWA, 2011). Em contrapartida, para responder às células e aos mediadores inflamatórios, as bactérias secretam produtos que são chamados de padrões moleculares relacionados a patógenos (PAMPs) e são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) expressos em células do sistema imune inato (PETER A, 2012)

Ocorre também à ativação de TLRs, que são receptores que ao serem ativados levam à síntese e liberação de uma série de mediadores. Entre os principais representantes dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) encontram-se os receptores tipo *toll* dos mamíferos, uma família composta por proteínas de membrana homólogas aos receptores *toll* de *Drosophila melanogaster* (MEDZHITOV et al., 1997). Alguns receptores tipo *toll* são expressos na superfície celular (como os TLR 1, 2, 4, 5 e 6), enquanto outros são expressos nas vesículas membranosas endocíticas ou até mesmo em outros compartimentos intracelulares, como é o caso dos TLR 3, 7, 8 e 9 (KAWAI; AKIRA, 2010).

Em consequência a ativação dos receptores via interação com um PAMP, ocorre o recrutamento de proteínas acessórias presentes no citoplasma e uma série de reações de fosforilação proteica é iniciada culminando na fosforilação do iKB (inibidor do fator Kappa B) e na liberação do NF-κB (fator nuclear κB). Esse é translocado para o núcleo da célula onde

induzirá a transcrição de vários genes que codificam a produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e oxido nítrico (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

As citocinas são produzidas a fim de promover a ativação e diferenciação da resposta imune (SCHULTE et al., 2013). Elas são produzidas por várias células do sistema imune - como neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células dendríticas – assim como por outros tipos celulares, a exemplo das células endoteliais, e exercem funções tanto pró-inflamatórias quanto reguladoras (STRIZ et al., 2014). Citocinas pro-inflamatórias incluindo, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, e IFN-γ e citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF-β e IL-4 induzem uma variedade de respostas celulares (BOOMER et al., 2014).

TNF-α é considerado como uma citocina de importância crítica no choque endotóxico e o dano tecidual. O TNF- α é produzido por macrófago, células dendríticas e outros tipos celulares. Entre suas principais funções, destaca-se a indução de quimiocinas e de cicloxigenase tipo 2 (COX-2), que catalisam a produção de NO e prostaglandina E2 (PGE2) respectivamente. Ambos NO e PGE2 são vasodilatadores que podem causar a redução da migração de neutrófilos para o sítio da infecção por inibição da ligação leucócito-endotélio (BOSMANN et al., 2012).

Assim como o TNF, a IL-1β também é liberada principalmente por macrófagos ativados, através de sinais de dois receptores distintos, denominados receptor tipo I (IL-1R1) e tipo II (IL-1R2), sendo estes responsáveis por exercerem efeitos similares nas células do sistema imune, tais como, hematopoese e extravasamento de células inflamatórias para o tecido (SCHULTE et al., 2013).

IL-6 é outra importante citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células, especialmente macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e células da musculatura lisa em resposta a estimulação com LPS, IL-1β e TNF-α (SCHELLER et al., 2006). A IL-6 apresenta efeitos locais e sistêmicos, incluindo a indução da síntese hepática de diversos outros mediadores inflamatórios como a estimulação da produção de neutrófilos na medula óssea e a diferenciação de linfócitos T auxiliares (helper) produtores de IL-17 (SCHULTE et al., 2013). É ainda, um importante regulador da homeostase em relação à temperatura corporal (CHAI et al., 1996).

Apesar das suas propriedades pró-inflamatórias, a IL-6 também possui um relevante papel como citocina anti-inflamatória. A IL-6 inibe a liberação de TNF e IL-1 (SCHINDLER et al., 1990) e aumenta os níveis de circulação dos mediadores anti-inflamatórios tais como IL-

10 e TGF-β (PAPANICOLAOU et al., 1998). Já, a IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos, mas também, linfócitos T, B e células NK (LATIFI et al., 2002).

A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) é uma quimiocina produzida por vários tipos celulares quer constitutivamente ou após a indução por estresse oxidativo, citocinas e fatores de crescimento (VAN COILLIE et al., 1999). Monócitos/macrófagos são a principal fonte dessa quimiocina (DESHMANE et al., 2009). MCP-1 é também um indutor fraco da expressão de citocina em monócitos e, em altas concentrações, desperta respiratory burst, que gera espécies reativas de oxigênio (MARTI, 2015).

Quimiocinas também exercem um papel importante durante o processo de sepse, visto que podem ser agrupadas em duas subfamílias funcionais: quimiocinas inflamatórias e homeostáticas. As primeiras são responsáveis por controlar o recrutamento de leucócitos, enquanto as últimas guiam os leucócitos para órgãos linfoides secundários, bem como na medula óssea e no timo durante a hematopoese (PALOMINO; MARTI, 2015).

Outro mediador inflamatório que atua no contexto infeccioso é o óxido nítrico (NO). Este é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor sintetizado a partir de oxigênio molecular e do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (DUSSE et al., 2003). O oxido nítrico representa um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, consistindo em um composto bastante reativo cuja liberação resulta em imediatas e variadas reações químicas diretas e indiretas (VINCENT et al., 2000).

Além da liberação de diversas moléculas pró-inflamatórias, alterações metabólicas e hemodinâmicas também caracterizam a sepse e contribuem para o agravamento do quadro clínico do paciente, tendo como consequência o comprometimento da funcionalidade de diversos órgãos e mortalidade na maioria dos casos. As disfunções orgânicas mais comuns são: cardiovascular, pulmonar, renal, neurológica e do aparelho digestivo. Posteriormente, ocorrem também disfunções hepáticas e hematológicas (HATTORI et al., 2017).

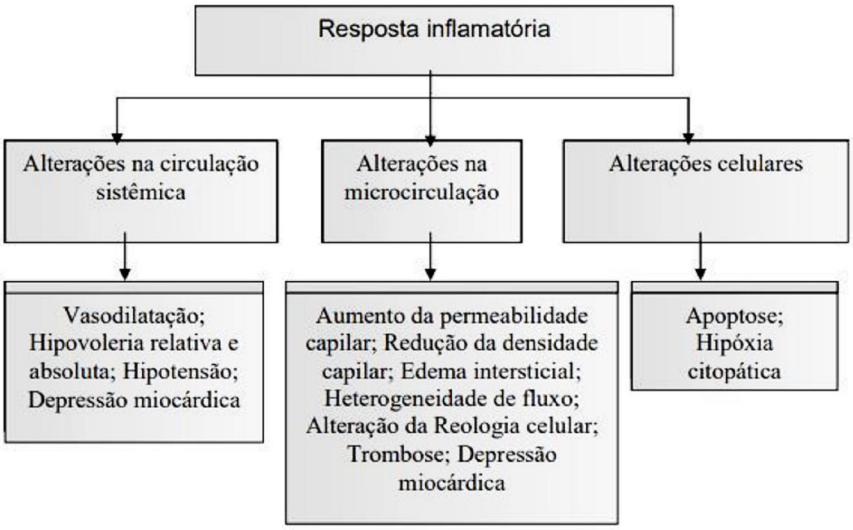

Figura 1: Principais mecanismos de disfunção orgânica.
Fonte: Cruz; Macedo, 2016.

Diante desse contexto de sepse que gera um processo inflamatório exacerbado, cada vez mais a pesquisa cientifica busca modelos experimentais que visam responder ou intervir nos prejuízos ocasionados por esta síndrome. Com isso, o uso de animais em modelos experimentais de sepse é fundamental para uma compreensão detalhada da sua fisiopatologia. (HARDAWAY et al., 1996; FINK, 2014).

2.4. Modelos Experimentais de Sepse

Alguns modelos de sepse empregam a administração de bactérias vivas por via intravenosa ou intraperitoneal (HARDAWAY et al., 1996; FINK, 2014). Estes modelos têm a relevância de mimetizar infecções pós-lesão observadas em ambientes clínicos (CHEN et al., 2014), sendo a *E. coli* a bactéria mais comumente empregada neste modelo. São usadas diferentes concentrações de *E. coli* e isso gera diferentes respostas em decorrência da infecção (PARKER & WATKINS, 2001). Como vantagens, este modelo pode mimetizar uma sepse clínica extrema (FINK & HEARD, 1990).

Entretanto, a administração de bactérias vivas pode levar a um imediato colapso cardiovascular e morte rápida, principalmente quando por via intravenosa, o que não ocorre na sepse humana (GARRIDO et al., 2004). A taxa de mortalidade depende das espécies de animais utilizados e o número de bactérias administradas, de modo que este modelo se torna mais

controlável e reprodutível do que, por exemplo, o modelo de *Cecal Ligation and Puncture* - CLP (RITTIRSCH et al., 2007).

O modelo de *Cecal Ligation and Puncture* (CLP) foi descrito inicialmente por Wichtermann et al., (1980), e adaptado por Baker et al., (1983). O modelo de CLP tem sido considerado o padrão ouro para pesquisa em modelos de sepse, uma vez que é o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, apendicite, colite ou peritonite pós-operatória (BENJAMIM, 2001). Após a perfuração da parede intestinal ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo um quadro de peritonite, o qual pode evoluir para sepse e choque séptico (DEJAGER et al., 2011).

Ainda, neste modelo, mediadores inflamatórios, como citocinas, apresentam um decurso temporal mais próximo da síndrome humana. Uma desvantagem desse modelo é que levando em consideração que a maioria dos pacientes com relato de sepse clínica e choque endotóxico são crianças e doentes idosos, esse modelo normalmente emprega animais adultos o que pode não traduzir de forma apropriada estes parâmetros clínicos (ANGUS et al., 2001).

A endotoxemia é outro modelo comumente usado para induzir a sepse em animais. (FINK, 2008). O produto de origem bacteriana mais utilizado neste modelo é o LPS, podendo este ser isolado de diferentes bactérias, e também por diferentes sorotipos de uma mesma bactéria (STARR & SAITO, 2014). A endotoxemia pode variar de acordo com a dose de endotoxina utilizada para a indução da sepse, sendo as vias de administração mais utilizadas a intravenosa e a intraperitoneal (FINK, 2014).

Dessa forma, uma vez injetada, a endotoxina inicia uma resposta inflamatória sistêmica que se assemelha em muitos aspectos com a sepse severa em humanos incluindo a produção sistêmica e local de diversos mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas. Além disso, a migração de células inflamatórias, coagulação intravascular disseminada e disfunção vascular levando a falência de múltiplos órgãos decorrentes da resposta inflamatória sistêmica (WARD, 2012).

2.5. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma espécie bacteriana encontrada no intestino grosso de humanos e animais de sangue quente (VILA et al., 2016). Essa espécie pode ser isolada de amostras fecais por meio do cultivo em meios de cultura seletivos e a mudança do pH, devido à fermentação da lactose presente no meio, pode diferenciar cepas fermentadoras ou não de lactose. É capaz de crescer em ambientes aeróbicos e anaeróbicos e prefere a temperatura de 37ºC, podendo ser móvel ou não (CROXEN et al., 2013).

As cepas de *E. coli* associadas a infecções intestinais são denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e podem ser classificadas em seis distintos patótipos, de acordo com seu sitio de colonização preferencial no hospedeiro, mecanismos de virulência e sintomas clínicos subsequentes à infecção. Os patótipos de DEC são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e *E. coli* que adere difusamente em culturas de células epiteliais (DAEC) (GOMES et al., 2016). Há ainda linhagens com habilidade especial para causar doenças fora do intestino e são denominadas *E. coli* patogênica extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000).

Existem diversos fatores de virulência relacionado à ExPEC que facilitam sua colonização a superfícies mucosas do hospedeiro, bem como auxiliam nos mecanismos de defesa contra o hospedeiro e na aquisição de nutrientes essenciais, tal como ferro (MAINIL, 2013). Os fatores de virulência característicos de ExPEC podem ser adesinas, polissacarídeos (incluindo cápsula e lipopolissacarídeos), toxinas, sideróforos, proteases, invasinas e proteínas de resistência ao soro (JOHNSON; RUSSO, 2002). Esses fatores de virulência são codificados por genes constituintes de ilhas de patogenicidade restritas às *E. coli* patogênicas, estando ausentes em bactérias comensais, tornando esses microrganismos agentes etiológicos de infecções no trato urinário, meningites em neonatos e sepse (KOGA et al., 2014).

No trato urinário também há incidência de infecções decorrentes desses patógenos, estando *E. coli* uropatogênica (UPEC) entre os agentes etiológicos mais comuns, sendo responsável por mais de 80% de todas as infecções urinárias (ULETT et al., 2013). As UPEC possuem um arsenal de fatores de virulências que favorecem a habilidade em causar doença, incluindo fimbrias, adesinas, toxinas, flagelo, proteínas auto transportadoras e sistema de aquisição de ferro (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010).

Outras infecções, como as infecções da corrente sanguínea, têm sido relacionadas a *E. coli* (WISPLINGHOFF et al., 2004; LAUPLAND et al., 2008; de KRAKER et al., 2013). As cepas que causam bacteremia possuem distintos fatores de virulência, incluindo fatores envolvidos na adesão, evasão do sistema imune, aquisição de ferro e toxinas, sendo também resistentes à ação bactericida do soro e de leucócitos (MIAJLOVIC et al., 2016). Esses diversos fatores de virulência podem, consequentemente, desencadear uma severa resposta inflamatória resultando em sepse, podendo garantir a persistência dessas bactérias no sangue e disseminação pelo organismo (HERZOG et al., 2014; MORA-RILLO et al., 2015).

Os microrganismos responsáveis por infecções em humanos exibem uma série de estratégias para impedir os mecanismos de ação do sistema imune, dentre as quais podemos citar: a produção de proteínas que mimetizam proteínas reguladoras do sistema complemento ou aquisição das proteínas reguladoras do hospedeiro; a inibição de C3 e C5 convertase ou da formação do complexo de ataque à membrana (MAC); inativação de anticorpos por meio da degradação ou ocupação da porção Fc dessas proteínas; a inativação das proteínas do sistema complemento via secreção de proteases, a exemplo da serinoprotease Pic (ABREU; BARBOSA, 2017).

2.6. Proteína envolvida na colonização (Pic)

Há diversos fatores de virulência produzidos por *E. coli*, e dentre eles tem-se as serinoproteases, que tem ganhado destaque nos últimos anos, a exemplo, de Pic que que é uma proteína extracelular de 109.8 kDa produzida por EAEC (HENDERSON et al., 1999), UPEC (PARHAM et al., 2004), EPEC (ABREU et al., 2016), além de *Shigella flexneri* 2 (RAJAKUMAR et al., 1997) e *Citrobacter rodentium* (CELIK et.al., 2012).

As serinoproteases são enzimas que possuem um sítio ativo que contém a tríade catalítica Ser/His/Asp, responsável por sua atividade proteolítica e são amplamente distribuídas entre vírus, bactérias e eucariotos, sendo, portanto, vitais para os organismos (PAGE; Di CERA, 2008; HEDSTROM, 2002; DODSON; WLODAWER, 1998). Em bactérias Gram-negativas, essas proteases são conhecidas como SPATEs (*serino protease autotransporter of Enterobacteriaceae*), uma família de proteases extracelulares produzidas por bactérias pertencentes à família *Enterobactericeae* (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

O termo “autotransportadoras” refere-se a um grupo de proteínas que contêm em sua estrutura todos os componentes necessários para seu transporte através das membranas interna

e externa da bactéria e posterior secreção. Esse mecanismo ocorre via um sistema de secreção Tipo V, presente em bactérias Gram-negativas (DAUTIN, 2010). Estruturalmente semelhantes, as proteínas autotransportadoras são compostas pelas seguintes regiões (Figura 4):

(1) Peptídeo sinal: importante para o reconhecimento e translocação da proteína pelo sistema secretor *Sec,* presente na membrana interna da bactéria;

(2) Domínio passageiro: parte secretada ao meio externo e que exerce atividade funcional;

(3) β-dominio: parte da proteína que forma um poro na membrana externa e permite a passagem e excreção do domínio passageiro.

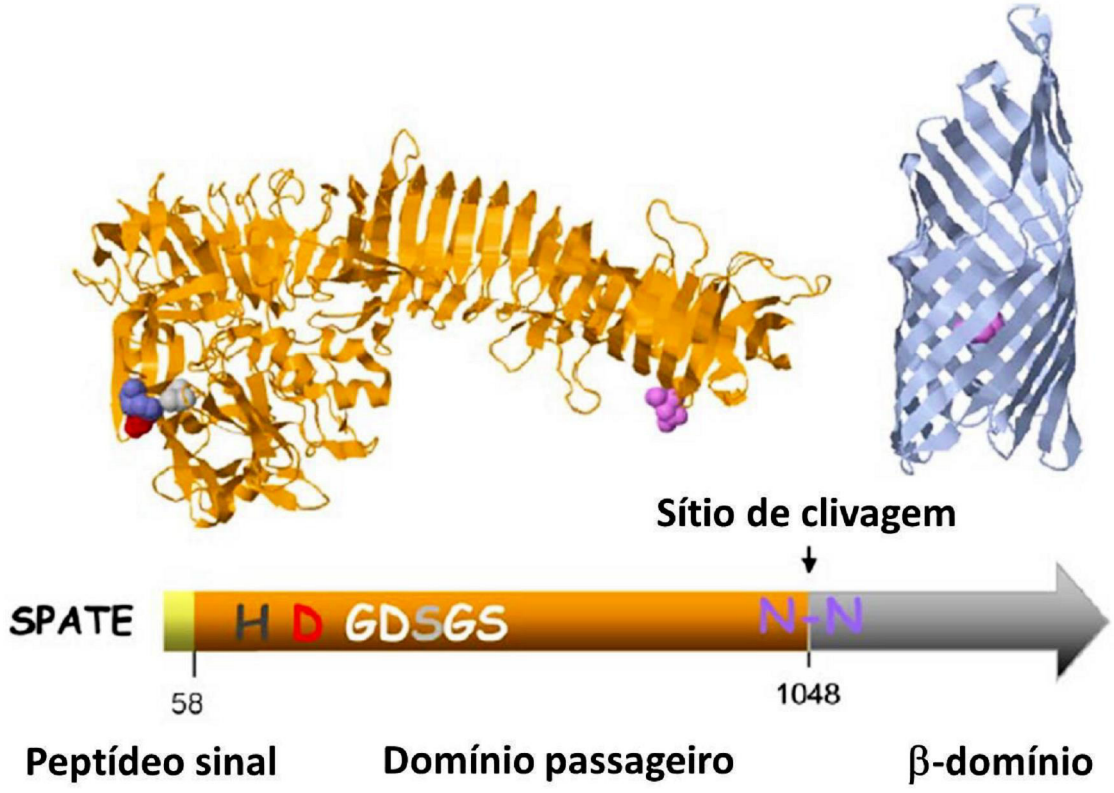

Figura 2: Estrutura geral das proteínas autotransportadoras.
Fonte: Adaptado de Ruiz-Perez e Nataro (2014).

Diversos papéis biológicos para Pic já foram descritos, incluindo hemaglutinação, atividade mucinolítica, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem de glicoproteínas de superfície de leucócitos, que estão envolvidas no tráfego, migração e inflamação (HENDERSON et al., 1999; RUIZ-PEREZ et al., 2011).

Foi observado a possível participação de Pic nas características patológicas da diarreia induzida por EAEC e diarreia mucoide em infecções por *Shigella* (NAVARRO-GARCIA et al., 2010). Pic possui a capacidade de clivar glicoproteínas presentes na superfície de várias linhagens de células hematopoiéticas, incluindo macrófagos, neutrófilos e linfócitos (RUIZ-PEREZ et al., 2011), além de promover resistência ao soro pela clivagem direta de moléculas-chave pertencentes às três vias da cascata do sistema complemento (ABREU et al., 2015).

Abreu e colaboradores (2015) mostraram que Pic produzida por EAEC 042 medeia a evasão imune pela clivagem direta de moléculas de complemento e assim reduz significativamente a ativação do complemento por todas as três vias. Também demonstraram, que Pic é capaz de clivar C3, uma molécula central da cascata de complemento, bem como C3b e proteínas das vias clássica e lectina, como C4 e C2. Além disso, foi observado a degradação dos componentes do complemento na proteína purificada e sobrenadante de cultura de *E. coli* HB101 que expressam Pic e indicaram que Pic também é ativo em um ambiente mais fisiológico, sendo capaz de clivar C3, C4 e C2.

Pic é capaz de induzir hipersecreção de muco intestinal (NAVARRO, et al., 2010). Devido à sua atividade mucinolítica, Pic também promove a colonização intestinal de ratos e coelhos pela clivagem do muco presente na luz intestinal, e dessa forma, pode aumentar a capacidade de adesão da bactéria (ABREU, 2016, MUNERA, 2011). Camundongos infectados com BA589 e BA589Δ*pic* mostraram uma colonização notável da cepa do tipo selvagem no fragmento cecal.

Assim, é evidente que patógenos produtores de Pic podem ser capazes de destruir a barreira protetora do epitélio intestinal causando a persistência bacteriana, invasão, migração para o trato urinário e alguns deles têm a capacidade de atingir a corrente sanguínea podendo causar sepse (HERZOG et al., 2014).

Dutra e colaboradores (2020), após cultivo de alíquotas do lavado peritoneal dos animais em ágar MacConkey, evidenciaram a presença de ambos os grupos bacterianos (F5 e seu mutante F5Δ*pic*), sendo o número de bactérias produtoras de Pic maior quando comparado ao mutante. Além disso, Pic é essencial para a permanência da bactéria na corrente sanguínea, pois em amostras de sangue foi detectada a presença de bactérias apenas nas amostras pertencentes ao grupo *E. coli* F5, produtora de Pic. A inoculação intraperitoneal de bactérias produtoras da serinoprotease Pic (*E. coli* F5) também induziu a morte de aproximadamente 66% dos animais

em até 12 h após a infecção. Os animais restantes morreram em até 24h após a inoculação bacteriana, refletindo numa mortalidade de 100% em até 24h após a indução da sepse.

Ainda foi mostrado por Dutra et al. (2020) tanto citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-12, MCP-1) como a citocina anti-inflamatória IL-10, aumentaram de modo significativo em relação aos grupos sem infecção e mutante F5Δ*pic*. Nesse mesmo estudo, o óxido nítrico das amostras de soro também foi produzido de forma mais acentuada pelos animais infectados por bactérias produtoras de Pic.

E é sabido que, o pacote de tratamento da sepse aborda um conjunto selecionado de elementos de cuidado que, quando implementados como um grupo, afetam os desfechos clínicos, simplificando os processos complexos de atendimento a esses pacientes. LEVY et al., 2018). Neste pacote está incluso, majoritariamente: Medir as concentrações séricas de lactato; Obter hemoculturas antes de iniciar antibióticos; Iniciar antibióticos de amplo espectro; Fazer ressuscitação volêmica com 30 mL/kg de cristaloide para hipotensão ou lactato maior ou igual a 4 mmol/L. Iniciar terapia vasopressora se o paciente apresentar hipotensão durante ou após a ressuscitação volêmica, para manter a pressão arterial média maior que 65 mmHg (CÁRNIO, et al., 2019).

Dessa forma, é importante a identificação e caracterização de alvos farmacológicos para a sepse, além do entendimento da relevância de compostos que possam ser possíveis tratamentos para infecções além de abrir novas perspectivas para o tratamento de doenças de cunho inflamatório.

2.7. Usos e potencial terapêutico da canela

As plantas medicinais e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos da Medicina Complementar e Alternativa – MCA e vêm há muito sendo utilizados pela população brasileira nos seus cuidados com a saúde (Brasil, 2012). Isso se dá pelo avanço na comprovação científica da eficácia e da segurança das plantas medicinais e dos medicamentos fitoterápicos, o saber popular neste campo, e também constata que o uso da terapêutica no uso de medicamentos sintéticos não cumpriu a promessa implícita e explícita de dar conta do tratamento das doenças, pelos altos custos, pelos significativos efeitos adversos que têm os medicamentos sintéticos, pelos resultados nem sempre satisfatórios, o que tem levado grande

número de pessoas a buscar formas alternativas de tratamento menos agressivas (BRUNING et al., 2012).

Considerando essas informações, observa-se que compostos provenientes da natureza podem auxiliar no tratamento de diversas doenças fornecendo diversos componentes químicos ativos úteis também, contra infecções causadas por bactérias, vírus e fungos, ao mesmo tempo em que oferece suporte terapêutico para múltiplos órgãos e sistemas do corpo (MCKENZIE et al., 2010).

A exemplo, o gênero *Cinnamomum,* que pertence ao gênero de plantas aromáticas da família Lauraceae, a qual compreende cerca de 250 espécies e é conhecida popularmente como canela (SHEN et al., 2012). Usos tradicionais desta espécie têm sido registrados em toda Ásia, África e Europa (SHEN et al., 2012). A canela é conhecida desde 2.500 anos a.C. pelos chineses, possuía mais valor do que o ouro e era utilizada para aromatizar molhos e vinhos brancos, sendo também utilizada para perfumes (NEGRAES, 2003).

A droga vegetal desta espécie corresponde à casca seca, contendo, no mínimo, 1,0 % de óleo volátil, constituído por 70,0% a 90,0% de trans-cinamaldeído e possui como sinonímia científica *Cinnamomum aromaticum*, canela-do-ceilão (*Cinnamomum verum*) e *Cinnamonum zeylanicum* (BRASIL, 2010). A Canela-da-china (*Cinnamomum cássia*) a mais popularmente conhecida, possui odor aromático característico e seu sabor é menos doce, levemente mucilaginoso e menos aromático que o da canela-do-ceilão (*Cinnamomum verum*) (BRASIL, 2010).

Diante desse contexto, a casca da canela possui um papel importante tanto para a pesquisa quanto para o uso popular, uma vez que contém uma grande quantidade do oléo essencial, cinamaldeído, o qual sugere-se que seja o principal componente responsável por seus efeitos (SHEN et al., 2012).

2.8. Cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal)

O cinamaldeído (trans-3-fenil-2-propenal) é o composto majoritário presente no óleo essencial de canela correspondendo a 67,58% dos compostos identificados neste óleo (Moritz et al.,2015). É um composto liquido, oleoso e amarelo. Há muito tempo o cinamaldeído é usado como agente aromatizante em gomas de mascar, sorvetes, bebidas e doces. (HOOTH et al., 2004).

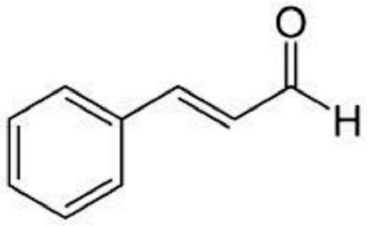

Figura 3 – Fórmula estrutural do cinamaldeído
Fonte: http://quimica-dos-alimentos.blogspot.com/p/blog-page_96.html - Molécula do Cinamaldeído

O primeiro relato do potencial imunomodulador do cinamaldeído foi descrito em 1998, em um estudo realizado por Koh e colaboradores, o qual demonstrou que o CNA é capaz de alterar a resposta imune *in vitro*, por promover o aumento da diferenciação de linfócitos humanos CD4+ /CD8+ positivos em CD4+ ou CD8+ positivos.

Esse potencial imunomodulador sugerido para o CNA tem direcionado estudos para o entendimento de seu mecanismo de ação. Estudos *in vitro* indicaram que parte dos efeitos imunomoduladores do CNA deve-se ao seu potencial de inibição da ativação do NF-κB (CHOI, 2009). Em 2007, sugeriu-se que o CNA inibe a ativação deste fator de transcrição, por regular diferentes vias de sinalização, incluído MAPKinases. Esta inibição acarreta subsequente inibição de vias inflamatórias importantes na sepse como a atividade da iNOS e COX-2 (KIM et al., 2007). Além disso, o CNA parece suprimir a resposta pelo TLR4 por inibir a oligomerizacão deste receptor (YOUN et al., 2008).

As atividades antimicrobianas do cinamaldeído também têm sido relatadas por Chen (2016), pelo fato do cinamaldeído conter compostos terpenóides ou fenólicos hidrofóbicos com atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos, incluindo fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Outro estudo também mostrou uma boa atividade antibacteriana, a partir de filmes a base de celulose adicionado ao CNA, com concentrações inibitórias mínimas que variaram de 0,78 a 50 µl/ml contra as bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Enterococcus faecalis* (SANLA-EAD, 2012).

Foi reportado efeito de inibição da divisão celular em *E. coli* devido ao impedimento da polimerização de proteína FtsZ pelo cinamaldeído (Domadia et al. 2007). Em trabalho de

Albano et al. (2016), o cinamaldeído apresentou CIM de 100 e 400 µg/mL para E. coli e S. aureus resistente à meticilina (MRSA), respectivamente. Nesse mesmo trabalho, o cinamaldeído inibiu a produção de enterotoxina estafilococócica C.

Os efeitos antiinflamatórios do transcinamaldeído já foram observados na linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7, no qual houve uma diminuição da produção de óxido nítrico (NO), induzida por lipopolissacáridos (LPS) (KIM, 2010). Além disso, houve a redução da expressão de mRNA e a expressão proteica da NO sintase indutível (iNOS) em macrófagos estimulados por LPS.

O tratamento também diminuiu o nível de expressão de mRNA e a secreção de IL1β, IL-6 e TNF-α em macrófagos ativados por LPS, inibindo a fosforilação de ERK, JNK e p38 MPAK nas células, assim evidenciando que o trancinamaldeído pode possuir um potencial farmacológico na inflamação (KIM, 2018).

Os efeitos imunomoduladores do CNA também já foram avaliados *in vivo*. Em um estudo realizado por Lin e colaboradores (2011), o tratamento repetido com CNA demonstrou ser capaz de inibir a concentração sérica de citocinas (IL-2, IL-4 e IL-10) em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina.

Ainda, o CNA é capaz de inibir a produção de NO, TNF e PGE_2 associada ao acúmulo de edema e células polimorfonucleares induzidos pela injeção de carragenina na pata de camundongos (LIAO et al., 2012), e regular a apoptose por inibição da ativação do NF-κB *in vivo* (KWON et al., 2010). Além disso, estudos com o CNA demonstraram que houve redução nos níveis de TNFα e IL-1β a nível sistêmico (MENDES, et al., 2015).

O CNA possui propriedades protetoras na sepse, promove o aumento da viabilidade de células inflamatórias peritoneais como as Ly6C+ o qual é acompanhado por um aumento no número absoluto de células. Sugere-se que o CND é capaz de modular a sepse por mecanismos dependentes e independentes da ativação do TRPA1. (MENDES, 2015).

Todas essas evidências abrem um grande número de possibilidades acerca do papel do CNA na regulação da resposta inflamatória frente a doenças infecciosas. E dessa forma, podendo ser uma alternativa para os estudos direcionados a sepse. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se há evidências de efeitos antimicrobianos ou imunomoduladores desse composto na sepse induzida por *E. coli* produtora de Pic.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade do cinamaldeído em animais submetidos à sepse induzida por *E. coli* produtora de Pic.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima do Cinamaldeído sobre *E. coli* produtora de Pic;
- Avaliar a citotoxidade do composto sobre células Vero;
- Acompanhar a sobrevida dos animais pré-tratados e pós-tratados com Cinamaldeído submetidos à sepse induzida por *E. coli* produtora de Pic;
- Avaliar a contagem de UCF nos órgãos.
- Determinar os mediadores inflamatórios, após indução da sepse.
- Avaliar a migração e atividade de leucócitos nos animais submetidos à sepse, bem como as células da medula óssea, baço e peritônio.

4. CAPÍTULO I

Cinnamaldehyde, the main active component of cinnamon, increases the survival of septic animals by reduction of lung lesions and systemic inflammation

Isabella F. S. Figueiredo[1,2]; Fabrícia S. Rego[1]; Carolina S. Rolim[1]; Leylane S. R. Alves[1]; Mariana A. Frazão[1]; Samilly F. Cadete[1]; Itaynara L. Dutra[1,2]; Raissa G. Assunção[1,2]; Johnny R. Nascimento[2]; Eduardo M. de Sousa[3]; Waldir P. Elias[4]; Flávia R. F. Nascimento[2]; Afonso G. Abreu[1,2,3]

[1]*Laboratório de Patogenicidade Microbiana, Universidade CEUMA, São Luís, Brazil;*

[2]*Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brazil;*

[3]*Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA, São Luís, Brazil;*

[4]*Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.*

Abstract

Sepsis is defined as the presence of life-threatening organ dysfunction, secondary to the organism's unregulated response to infection. Recently, we shown that Pic-producing *Escherichia coli* induces lethal sepsis in mice. Cinnamaldehyde is a cyclic terpene alcohol that has broad spectrum and antioxidant antimicrobial activity. This study aimed to evaluate cinnamaldehyde activity in animals submitted to sepsis induced by Pic-producing *E. coli*. The *E. coli* F5 strain was incubated with cinnamaldehyde in concentrations ranging from 0.2 to 25 mg/mL to determine the minimum inhibitory concentration. To assess a possible cytotoxic effect, cinnamaldehyde was incubated with Vero cells for a period of 48 h and analyzed by MTT. The animal survival was performed with Swiss mice during five days. Treated and prophylactic groups received different concentrations of cinnamaldehyde (30mg/kg and 60mg/kg). After survival analysis, blood cell, peritoneal cavity and organs were evaluated, as well as the production of inflammatory mediators and colony-forming units (CFUs). It was determined that cinnamaldehyde at a concentration of 6 mg/mL inhibited bacterial growth. In the cytotoxicity assay, cinnamaldehyde in none of the concentrations used was toxic. Cinnamaldehyde 60 mg/kg, managed to keep 33% of the mice alive after infection. In addition, the CNA has demonstrated potential anti-inflammatory and immunomodulatory potentials that can help control the lethal events of sepsis.

Keywords: Sepsis; *Escherichia coli*; Pic; Cinnamaldehyde.

Introdução

A sepse é definida como a presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo frente à infecção (Singer et al., 2016). Sabe-se que a sepse tem alta prevalência de morbidade e mortalidade, além de gerar altos custos para os serviços de saúde. Seu reconhecimento precoce e o tratamento adequado são fatores primários para a mudança deste cenário. Além disso, a implementação de protocolos clínicos gerenciados é uma ferramenta útil nesse contexto, auxiliando as instituições na padronização do atendimento ao paciente séptico, diminuindo desfechos negativos e proporcionando melhor efetividade do tratamento (ILAS, 2018).

A Fisiopatologia da sepse se dá através do mecanismo de defesa do organismo frente à resposta do hospedeiro na presença de um agente agressor infeccioso. Diante desse contexto de infecção e resposta imunológica, ocorrem fenômenos inflamatórios que incluem a ativação de citocinas, produção de óxido nítrico e dos radicais livres de oxigênio, bem como a expressão de moléculas de adesão no endotélio, além de outras alterações importantes nos processos de coagulação e fibrinólise (Hotchkiss et al., 2009).

A *Escherichia coli* é uma espécie bacteriana encontrada no intestino grosso de humanos e animais de sangue quente (Vila et al., 2016). Fatores de virulência são codificados por genes constituintes de ilhas de patogenicidade restritas às *E. coli* patogênicas, estando ausentes em bactérias comensais, tornando esses microrganismos agentes etiológicos de infecções no trato urinário, meningites em neonatos como também podem causar sepse (Koga et al., 2014).

Há diversos fatores de virulência produzidos por *E. coli*, e dentre eles tem-se a produção de serinoproteases, a exemplo, de Pic que que é uma proteína extracelular de 109.8 kDa produzida por EAEC (Henderson et al., 1999). Em bactérias Gram-negativas, essas proteases são conhecidas como SPATEs (*serino protease autotransporter of Enterobacteriaceae*), uma família de proteases extracelulares produzidas por bactérias pertencentes à família *Enterobactericeae* (Ruiz-Perez; Nataro, 2014).

Já foram descritos vários papéis biológicos para Pic, incluindo hemaglutinação, atividade mucinolítica, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem de glicoproteínas de superfície de leucócitos, que estão envolvidas no tráfico, migração e inflamação (Ruiz-Perez et al., 2011; Henderson et al., 1999). Além disso, promove a colonização intestinal de ratos e coelhos pela clivagem do muco presente na luz intestinal,

favorecendo assim a adesão da bactéria aos enterócitos (Abreu et al., 2016; Munera et al., 2014; Harrington et al., 2009), bem como capacidade de clivar diversas moléculas do Sistema complemento (Abreu et al., 2015), contribuindo, assim para o estabelecimento da sepse (Dutra et al., 2020).

Sabe-se, que o pacote de tratamento da sepse aborda um conjunto selecionado de elementos de cuidado que, quando implementados como um grupo, afetam os desfechos clínicos, simplificando os processos complexos de atendimento a esses pacientes. LEVY et al., 2018).

Neste pacote está incluído, majoritariamente: Medir as concentrações séricas de lactato; Obter hemoculturas antes de iniciar antibióticos; Iniciar antibióticos de amplo espectro; Fazer ressuscitação volêmica com 30 mL/kg de cristaloide para hipotensão ou lactato maior ou igual a 4 mmol/L. Iniciar terapia vasopressora se o paciente apresentar hipotensão durante ou após a ressuscitação volêmica, para manter a pressão arterial média maior que 65 mmHg (CÁRNIO, et al., 2019)

Diante desse contexto, as plantas medicinais e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos da medicina complementar e alternativa, e vem há muito sendo utilizados pela população brasileira nos seus cuidados com a saúde (Brasil, 2012). A casca da canela vem sendo amplamente estudado para fins terapêuticos e possui um papel importante tanto para a pesquisa, quanto para o uso popular, uma vez que contém uma grande quantidade do óleo essencial, sendo o cinamaldeído o principal constituinte, responsável por seus principiais efeitos (Shen et al., 2012).

Diversas atividades antimicrobianas do cinamaldeído também têm sido relatadas (Chen, 2014), principalmente por conter compostos terpenóides ou fenólicos hidrofóbicos com atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos, incluindo fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Chen, 2016).

O CNA possui propriedades protetoras na sepse, pois promove o aumento da viabilidade de células inflamatórias peritoneais como as Ly6C+ o qual é acompanhado por um aumento no número absoluto de células (Mendes, 2015). Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos do cinamaldeído no tratamento de camundongos com sepse induzida por *E. coli* produtora de Pic.

Material e métodos

Isolados de bactéria

Neste estudo foi utilizada a amostra *E. coli* F5, isolada de um caso de bacteremia no Hospital São Paulo, na cidade de São Paulo (Dutra et al, 2020). A amostra foi mantida a -80°C em caldo de soja tripticase (TSB) acrescido de glicerol a 20% e cultivada em caldo Luria-Bertani (LB), ágar LB ou MacConkey, acrescido de antibiótico apropriado quando indicado.

Teste de concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Após cultivo bacteriano em caldo Mueller Hinton (MH) com crescimento até densidade óptica ($D.O._{600}$) de 0.1 nm, a bactéria foi incubada com o cinamaldeído (Sigma-Aldrich) em concentrações que variaram de 0.2 a 25 mg/mL utilizando placas de 96 poço e adicionado o antibiótico Clorafenicol para controle bacteriano. Em seguida, os mesmos foram incubados a 37º por 24 horas e após esse período foi utilizado a Resazurina (0,03%) para determinar a concentração inibitória mínima. Após o resultado do MIC, placas com ágar MacConkey foram utilizadas para determinação da CBM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Ensaio de Citotoxidade sobre célula Vero

Para avaliar um possível efeito citotóxico do cinamaldeído, diversas concentrações do composto foram incubadas com células Vero por um período de 24 h. Após o período de incubação foram adicionados 100 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) em cada poço e as placas incubadas por 3 h a 37º C e 5% de CO_2. Em seguida, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço e as amostras foram homogeneizadas para uma completa dissolução dos cristais de formazan. O conteúdo de cada poço foi submetido à determinação da absorbância no comprimento de onda de 550 nm.

O ensaio de MTT baseia-se na medida do dano induzido pelo composto em estudo no metabolismo celular de glicídios usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. É utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o MTT presente no meio reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira, a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSSMAN, 1983).

Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss entre 4 a 8 semanas de vida para o modelo de sepse por inoculação intraperitoneal (IP), obtidos do Biotério Central da Universidade CEUMA. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios técnicos e éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade CEUMA (Processo n° 14/18).

Avaliação da sobrevida de animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias

Um total de 42 camundongos foi dividido em 7 grupos experimentais (n=6 animais/grupo) para avaliação da sobrevida. Nos grupos 1 e 2 foram administrados, por gavagem, PBS e cinamaldeído, respectivamente (Controles negativois). No grupo 3, os camundongos foram infectados com *E. coli* F5 (200 uL da suspensão bacteriana, na concentração de $1x10^9$ UFC) (Controle positivo da infecção). Os grupos 4 e 5 receberam por gavagem o cinamaldeído nas concentrações de 30mg/kg e 60mg/kg durante 5 dias antes da infecção (Grupos profiláticos).E os grupos 6 e 7 foram infectados com E.*coli* F5 e aós 2 h receberam o tratamento com cinamaldeído nas dosagens de 30mg/kg e 60mg/kg, respectivamente (Grupos tratados). A inoculação bacteriana se deu por via intraperitoneal na região abdominal de camundongos.

Após a análise da sobrevida, foi possível observar que a dose que mais mantinha os animais vivos era a de 60mg/kg nos grupos tratados pós infecção. Então, outros 24 animais foram divididos em 4 grupos (n = 6/grupo) para coleta das amostras. Assim, nos grupos 1 e 2 foram administrados, por gavagem, PBS e cinamaldeído, respectivamente (Controles negativos). No grupo 3, os camundongos foram infectados com *E. coli* F5 (Controle da infecção), e no grupo 4 os animais foram infectados com *E. coli* F5 e tratados com cinamaldeído na dosagem de 60 mg/kg, após 2h da infecção. Após 12 horas foi realizada a eutanásia dos camundongos para a coleta das amostras, conforme previamente descrito por Dutra et al. (2020).

Obtenção das células do baço, da medula óssea e das células peritoneais

Os camundongos foram sacrificados 12 h após a indução de sepse e as células peritoneais foram assepticamente coletadas com 4 mL de PBS. Para a determinação do número

total, as células peritoneais foram coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1 (MACIEL et al., 2014). As células foram contadas com auxílio de um hemocitômetro (Sigma, USA). A contagem das células foi feita com auxílio de microscópio óptico de luz comum. As células do baço e medula óssea foram obtidas das seguintes formas: o fêmur foi perfundido com 1 mL de PBS para obtenção das células da medula óssea; o baço foi triturado e as células resultantes foram lavadas com 5 mL e 1 mL de PBS, respectivamente. Para determinar o número total de células, nove volumes de células foram adicionados a 1 volume de cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30% (MACIEL et al., 2014). As células foram contadas com auxílio de um hemocitômetro (Sigma, St. Louis, MO, USA) em microscópio óptico de luz comum.

Determinação da concentração de citocinas

Após os ensaios de infecção bacteriana o soro e o líquido peritoneal dos animais foi obtido para realização das dosagens de citocinas por citometria de fluxo. A quantificação de citocinas secretadas (IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-10, TGF-β) foi avaliada por CBA (Cytometric Bead Array) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA).

Dosagem de óxido nítrico no soro

O soro dos animais foi utilizado para dosagem de nitrito como forma indireta de avaliar a produção de óxido nítrico. Em uma placa de 96 poços foi feito, primeiramente, a curva padrão com 100 uL de nitrito + 100 uL de PBS como controle de quantidade de óxido nítrico por poço. Nos outros poços foi adicionado 50 uL de Reagente de Griss + 50 uL da amostra, no caso o soro dos camundongos. A placa então foi revestida com papel alumínio e esperou-se 30 min para então fazer a leitura da placa, conforme protocolo adaptado de Miranda et al. (2001).

Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's)

Após a eutanásia dos animais, a cavidade peritoneal destes foi lavada com 5 ml de PBS estéril e alíquotas de diluições seriadas do fluido peritoneal foram semeadas em placas de Petri contendo meio Agar MacConkey (Sigma) para avaliação da presença de bactérias. No caso dos órgãos (baço, rim, fígado e pulmão), fragmentos dos mesmos foram macerados e homogeneizados em PBS 1x estéril (pH 7,4) e diluições seriadas foram semeadas em ágar MacConkey. As unidades formadoras de colônias foram contadas após incubação a 37°C e os resultados foram expressos como Log de UFC/mL.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism, versão 8. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e submetidos a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Turkey, teste T ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney quando o pressuposto de normalidade dos dados não era satisfeito. Para a análise da sobrevida, utilizou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste de Long-Rank.

Resultados

O cinamaldeído promove um efeito bactericida sem induzir citotoxicidade em células Vero

Foram realizados testes de Concentração Mínima Inibitória para avaliar o efeito *in vitro* do cinamaldeído sobre *E. coli* F5 produtora da serinoprotease Pic. Foi possível determinar que o cinamaldeído na concentração de 6mg/mL inibiu o crescimento bacteriano e a concentração de 12 mg/mL foi bactericida para a mesma.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para verificar um possível efeito tóxico do cinamaldeído, em diferentes concentrações, sobre as células Vero. Conforme mostrado na figura 1, o Cinamaldeído nas concentrações utilizadas (0,2 a 6 mg/mL) não apresentou efeito tóxico para as células Vero, mesmo após incubação por 48 h.

O tratamento com cinamaldeído aumenta a taxa de sobrevida de animais sépticos

O pré-tratamento com CNA na dose de 30 mg/Kg v.o durante cinco dias não aumentou a sobrevida dos camundongos. No entanto, o pré-tratamento com CNA na dose de 60 mg/Kg v.o, durante o mesmo período, aumentou a taxa de sobrevida dos animais em 16,6% comparados com animais infectados e que não receberam tratamento (Figura 2).

Os animais tratados com CNA na dose de 30mg/Kg (v.o, 2h após infecção) não sobreviveram após a indução da sepse. Porém, 33% dos animais tratados com CNA na dose de 60mg/Kg (v.o, 2h após infecção) sobreviveram à sepse durante os cinco dias de tratamento quando comparados com os animais infectados ou com camundongos que receberam a dose de CNA (30mg/Kg v.o, 2h) ($p>0,0001$) (Figura 3).

O composto não apresentou efeito bactericida em modelo animal

Foi realizada a contagem de UFCs após cultivo de alíquotas dos órgãos macerados (fígado, rim, pulmão e baço) dos animais em ágar MacConkey. Nos controles PBS e CNA não houve crescimento bacteriano, entretanto, nos grupos *E. coli* e *E. coli* + CNA foi possível observar um elevado número de bactérias, não havendo diferença significativa no número de bactérias entre os grupos *E. coli* e *E. coli* + CND (Figura 4). O mesmo foi observado na contagem de UFC após cultivo de alíquotas do sangue e lavado peritoneal em ágar MacConkey (Figura 5).

O cinamaldeído aumentou o número total e diferencial de células do sangue nos animais sépticos

O hemograma mostrou uma redução na quantidade total e diferencial de leucócitos no sangue dos animais infectados, quando comparado com os animais sem infecção (Figura 6). Contudo, após o tratamento com o Cinamaldeído, foi possível observar um aumento discreto, mas significativo de linfócitos.

Entretanto, não foi possível observar alterações na quantidade de células totais do baço entre os grupos (Figura 7).

Cinamaldeído promove um aumento da produção celular na medula óssea e no peritônio

Foi observado alteração na produção da quantidade de células do peritônio (Figura 8) entre os grupos. Além disso, foi possível observar que o tratamento com cinamaldeído induziu o aumento de células na medula dos animais sépticos quando comparados com animais sépticos que não receberam o tratamento (Figura 9)

O tratamento com cinamaldeído reduziu de forma significativa a produção de óxido nítrico de animais sépticos.

Como observado na figura 10, houve um aumento na produção de NO no soro dos animais do grupo *E. coli*, quando comparados com os demais grupos. Importante observar que o tratamento com CNA reduziu de forma significativa a produção de NO quando comparado com o grupo *E. coli* não tratado (Figura 10).

Cinamaldeído promove redução de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro e peritônio

Tanto citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10, MCP-1), como a citocina anti-inflamatória IL-10 foram detectadas nas amostras de soro e do lavado peritoneal do grupo *E. coli*, de modo significativo em relação aos demais grupos. Tanto no soro (Figura 11) quanto no peritônio (Figura 12) houve uma redução de todas estas citocinas no grupo tratado com CNA, exceto a citocina TNF-α no soro.

Discussão

Neste trabalho, foi demonstrado pela primeira vez, que o cinamaldeído (CNA), na concentração de 60mg/kg, v. o, aumentou a sobrevida de camundongos com sepse induzida por *E. coli* F5 produtora da serinoprotease Pic. Além disso, a partir do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi possível demonstrar que o CNA em concentrações acima de 6 mg/mL foi bactericida para *E. coli* F5, corroborando dados da literatura. Colina et al. (2013), ao testarem o cinamaldeído frente às bactérias *Listeria innocua* e *Salmonella entérica* sorovar, demonstraram que o CNA foi o mais potente bactericida dentre os produtos testados. Ressaltam ainda que, após estudos mais detalhados acerca do mecanismo de ação do composto, o mesmo poderia ser utilizado como alternativa no combate a contaminação de alimentos.

Estudos recentes evidenciam que a inoculação intraperitoneal de bactérias produtoras da serinoprotease Pic (*E. coli* F5) induz a morte de aproximadamente 100% dos animais em até 24 h após a infecção (Dutra et al., 2020). Nosso estudo mostrou que os animais sépticos infectados com a mesma bactéria tiveram um aumento da sobrevida em 33% durante 5 dias após receberem o tratamento com CNA na dose de 60mg/kg. Também foram avaliados diversos parâmetros sistêmicos relacionados à sepse: citocinas, oxido nítrico, células imunológicas, Unidades Formadora de Colônias (UFC), bem como órgãos vitais ao funcionamento do organismo como fígado, pulmão, baço e rins.

Os dados obtidos demonstram que o CNA pode modular o sistema imune, reduzindo a concentração de citocinas e os níveis de NO e aumentando a quantidade de células na medula óssea. Esse aumento da sobrevida possivelmente ocorreu devido a uma modulação na resposta celular e de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios.

Estudos já mostraram que há um aumento nas populações de células circulantes no processo de sepse, assim como daquelas no sítio inicial da infecção (células mononucleares e polimorfonucleares) (Wiersinga et al., 2014). Além disso, a patogênese da sepse está relacionada a uma disfunção generalizada da resposta inflamatória, sobretudo no âmbito celular, a qual implica no aumento da morbidade dos pacientes acometidos (Luan et al., 2014). Nosso estudo mostrou que nos camundongos sépticos tratados com CNA houve um aumento

na quantidade de células da medula no processo de sepse, o que favoreceu a resposta imunológica por aumentar a quantidade de célula no sangue disponíveis para conter a infecção.

Mendes et al. (2015) avaliaram as populações de células inflamatórias em amostras de sangue periférico e de lavado peritoneal de camundongos com sepse induzida por LPS tratados com CNA. Os resultados mostraram que em 24 horas após a sepse ocorreu um aumento acentuado do número de células mononucleares no sangue. Diferente deste, nosso estudo, demonstrou uma diminuição significativa de células totais no peritônio de animais sépticos e de animais sépticos tratados com CNA. Essas discordâncias nos resultados, provavelmente, se devem à diferença entre os modelos de sepse utilizados, já que nosso estudo utilizou inoculo bacteriano e o de Mendes et al., 2015 utilizou LPS.

Também já foi demonstrado que no contexto da sepse ocorre uma diminuição em linfócitos do sangue periférico (LE TULZO et al., 2002; HOTCHKISS et al., 2005), e que pacientes com sepse tendem a ter uma diminuição persistente no número absoluto de linfócitos durante a sepse (LE TULZO et al., 2002). Com isso, tanto o aumento quanto a diminuição dessas células no sangue ou no sitio infeccioso levam a distúrbios na produção de mediadores inflamatórios. Nosso grupo já havia demonstrado que a sepse induzida por *E. coli* F5 causa elevada produção sérica de NO (Dutra, 2020). Os estímulos inflamatórios intensos durante um estado de sepse podem aumentar a produção desse mediador inflamatório, promovendo a vasodilatação periférica, queda da pressão arterial, com consequente redução da perfusão sanguínea e hipóxia tecidual, o que contribui para a falência de múltiplos órgãos (Ellis et al., 2002; Trzeciak et al., 2007).

Nossos dados evidenciam que o cinamaldeído na concentração de 60 mg/kg, v.o promove diminuição de NO em camundongos sépticos tratados. O NO é uma importante molécula, que participa do processo de oxidação celular, levando na maioria das vezes, a morte dessas células. A produção excessiva de NO pode prejudicar o processo de adesão ao endotélio, rolamento e migração de neutrófilos para o foco infeccioso (Benjamin et al., 2002). Estudos já demonstraram, que o CND foi capaz de suprimir a produção de NO (Wang et. al., 2018).

Um estudo feito por Sayed et al. (2013) demonstrou que camundongos tratados com CNA (40 mg/kg), apresentaram uma melhora na função renal e que este efeito está relacionado às propriedades antioxidantes do CNA. Assim, a redução do NO, encontrada no nosso estudo pode ser decorrente das propriedades antioxidantes inerentes a esse composto.

Além do NO, há outros mediadores endógenos liberados, primeiramente, por células residentes e, posteriormente, por células recrutadas para o foco infeccioso. A exemplo, as citocinas, que desempenham um papel primordial na resposta do hospedeiro (Benjamin, 2004). As citocinas, mais estudadas durante o processo de sepse são as citocinas TNF e IL-1, ambas são capazes de ativar alvos celulares e induzir a produção de mais mediadores inflamatórios. Outras citocinas que também são importantes na resposta do hospedeiro são a IL-6 e IL-10. Trabalhos também têm relatado a alta produção de citocinas no contexto da sepse, a exemplo da IL-6, bem como da quimiocina MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) (Maciel et al., 2014; Rios et al., 2017).

Recentemente, nosso grupo demostrou que a serinoprotease Pic é uma importante molécula indutora da produção de citocinas e quimiocina, visto que citocinas dosadas (IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-10, MCP-1) foram detectadas nas amostras de soro do grupo *E. coli* F5 de modo significativo, em relação aos grupos controle (Dutra et al., 2020). Ao tratar animais sépticos com CNA (60mg/kg v.o) foi possível observar uma redução de todas estas citocinas dosadas (IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10, MCP-1), tanto no soro quanto no peritônio, exceto TNF-α no soro.

Estudos *in vitro* tem reportado o efeito anti-inflamatório do CNA, reduzindo a liberação de citocinas como TNF, IL-1 e IL-6 (PANNEE, 2014). Liao e colaboradores (2012), relataram que o CNA reduz os níveis de TNF induzido por LPS em macrófagos murinos, bem como em modelo de edema de pata induzido por carragenina. Lin (2011) também relatou um efeito modulador do CNA na liberação de IL-10. Zhong, et. al. (2013) ao fazerem testes *in vivo,* relataram tais propriedades do CNA e com o extrato da canela em modelos de endotoxemia, relataram a diminuição sérica de TNFα com doses de 20 e 100 mg/kg. Lin (2011) também demonstrou o efeito modulador do CNA na liberação de IL-10. Lee et al. (2015) demonstraram uma redução nos níveis de IL-1β e TNFα quando administrados em animais sépticos nas doses de 13 e 26 mg/kg. Mendes et al. (2015) demonstraram que o CNA promoveu a redução dos níveis de TNFα e IL-1β a nível sistêmico.

É valido ressaltar que a redução de citocinas inflamatórias ou anti-inflamatórias em alguns casos é importante, uma vez que o aumento exacerbado de algumas citocinas pode levar a morte. Já é relatado que altas concentrações de MCP-1 também têm sido relacionadas com mortalidade na sepse em humanos. Zhu et al. (2017) detectaram concentrações plasmáticas de MCP-1 mais elevadas em pacientes que faleceram do que entre os sobreviventes.

Em síntese, nossos resultados mostram que o cinamaldeído na concentração de 60mg/kg, mesmo sem controlar a infecção, apresentou um efeito imunomodulador, aumentando

a sobrevida dos animais sépticos. O composto também foi capaz de induzir o aumento de linfócitos provenientes da medula, bem como a redução dos níveis de NO e citocinas, o que promoveu um controle da infecção e diminuição dos efeitos deletérios dessa síndrome.

Referências

1. Singer M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-hari, M.; Annane, D.; Bauer M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. v. 8, p. 315- 801; 2016.
2. Instituto Latino Americano de Sepse. Implementação de *Protocolo Gerenciado de Sepse Protocolo Clínico:* Atendimento ao paciente adulto com sepse / choque séptico. São Paulo; 2015.

3. Hotchkiss, R & Skarl, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348(2), 138-150; 2009.

4. Vila J, Sáez-López e, Johnson Jr, Jömling U, Dobrindt U, Cantón R, Giske Cg, Naas T, Carattoli A, Martínez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodríguez-Baño J, Baquero F, Soto SM. Escherichia coli: an old friend with new tidings. FEMS Microbiol Rev; 40(4):437-463; 2016.

5. Koga VL, Tomazetto G, Cyoia PS, Neves MS, Vidotto MC, Nakazato G,Kobayashi RKT. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from human blood culture in Brazil. BioMed Research International; 1-9; 2014.

6. Henderson I. R; Czeczulin, J; Eslava, C; Noriega, F; Nataro, J. P; Charactezation of Pic, a secreted protease of Shigellaflexneri and enteroagregative Escherichia coli. Infect. Immun. Int. 67:5587-96;1999

7. Ruiz-Perez, F; Nataro, J. P; Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. Cell. Mol. Life Sci. v.71, p. 745-770; 2014.

8.Abreu, A.G; Abe, C M, Nunes, K.O; Moraes, C. T, Chavez-Duenas, L; Navarro-Garcia, F; Barbosa, A. S, Piazza, R. M, Elias, W. P. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic Escherichia coli. Gutmicrobes. Int. 7:115-125; 2016.

9. Abreu, A. G; Fraga, T. R; Martinez; A. P. G; Kondo, M. Y; Julian M. A; Juliano, L; Navarro-Garcia, F; Isaac, L; Barbosa, A. S; Elias, W. P; The serine protease Pic from enteroaggregative Escherichia coli mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. J. Infect. Dis. int. 212, p. 106-115; 2015.

10. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: Anvisa; 2012.
11. Shen, Y., Jia, L., Honma, N., Hosono, T., Ariga, T., Seki, Y. Beneficial Effects of Cinnamon on the Metabolic Syndrome, Inflammation, and Pain, and Mechanisms Underlying These Effects – A Review. Journal of Traditional and Complementary Medicine. V. 1. p. 27-32; 2012.

12. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia brasileira.5.ed. Brasília: Anvisa, 2v/il. 5 ed. 718-723, 852p; 2010

13. Moritz, C. M. F. Assessment of antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil combined with EDTA and polyethylene glycol in yogurt. *Acta Scientiarum-Technology,* 99-104; 2015.
14. Chen P., Stanojcic, M., Jeschke, M.G. Differences between murine and human sepsis. The surgical clinics of Noth America. P. 1135-1149; 2014.

16. Chen, H.; HU, X.; Chen, E.; WU, S.; Mcclements, D.J.; LIU, S.; LI, B.; LI, Y. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. Food Hydrocoll.61, 662–671; 2016.

17. Mendes, S. J. F. Efeito imunomodulador do cinamaldeído no tratamento da sepse induzida em camundongos. (Dissertação) (Dissertação em Biologia Parasitária) – CEUMA, São luís; 2015.

18. Dutra, I. L.; Araujo, L. G. ; Assuncao, R. G. ; Lima, Y. A. ; Nascimento, J. R. ; Vale, A. A. M. ; Alves, P. C. S. ; Trovao, L. O. ; Santos, A. C. M. ; Silva, R. M. ; Silva, L. A. ; Maciel, M. C. G. ; Sousa, E. M. ; Elias, W. P. ; Nascimento, F. R. F. ; Abreu, A. G. . Pic-Producing Escherichia coli Induces High Production of Proinflammatory Mediators by the Host Leading to Death by Sepsis. International journal of molecular sciences; 2020.

19. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, Van Der Poll T. Host innate immune responses to sepsis, Virulence; 5(1):36-44; 2014.

20. Luan, Y., Dong, N., Xie, M., Xiao, X., Yao, Y. The Significance and Regulatory Mechanisms of Innate Immune Cells in the Development of Sepsis. Journal of interferon & cytokine research. V. 34; 2014

21. Mendes, S. J. F. Efeito imunomodulador do cinamaldeído no tratamento da sepse induzida em camundongos. (Dissertação) (Dissertação em Biologia Parasitária) – CEUMA, São luís; 2015.

22. Le Tulzo, Y., C. Pangault, A. Gacouin, V. Guilloux, O. Tribut, L. Amiot, P. Tattevin, R. Thomas, R. Fauchet, And B. Drenou. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. Shock; 18:487; 2002.

23. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathway. The Journal of Immunology; 174:5110-5118; 2005.

24. Hotchkiss, R & Skarl, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348(2), 138-150; 2009.

25. Ellis CG, Bateman RM, Sharpe MD, Sibbald WJ, Gill r. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O (2) extraction in sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282:H156-H164; 2002.

26. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, Arnold RC, Colilla S, Zanotti S, Hollenberg SM. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with

severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. Ann Emerg Med; 49:88-98, 2007.

27. Benjamim, C. F; Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. Revista de Medicina de Riberão Preto. v. 34, p. 18-26; 2001.

28. Benjamim, C. F; FERREIRA, S. H; CUNHA, F. Q; Role of oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. J. Infec. Dis. v. 182, p 214-223; 2000.

29. Wang, Y.; Zhang, Y. Shi, Y.; Pan, X.; Lu, Ping, Y. Antibacterial effects of cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) bark essential oil on Porphyromonas gingivalis. Cao. Microbial pathogenesis; 2018.

30. El-Sayed El-Sm, Abd El-Raouf OM, Fawzy HM, Manie MF. Comparative study of the possible protective effects of cinnamic acid and cinnamaldehyde on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Biochemical Molecular Toxicology. P. 508-514; 2013.

31. Benjamim, C.F., Lundy, S.K., LukaCS, N.W., Hogaboam, C.M., Kunkel, S.L. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. Blood. P. 88-95, 2004.

32. Maciel, M. C. G; Fialho, E. M. S; Guerra, R. N. M; Borges, V. M; Kwasniewski, F. H; Nascimento, F. R.; Tityusserrulatus scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. Toxicon, v. 89, p. 1-8; 2014.

33. López-Mata, M.A.; Ruiz-Cruz, S.; de Jesús Ornelas-Paz, J.; del Toro-Sánchez, C.L.; Márquez-Ríos, E.; Silva-Beltrán, N.P.; Cira-Chávez, L.A.; Burruel-Ibarra, S.E. Mechanical, barrier and antioxidant properties of chitosan films incorporating cinnamaldehyde. J. Polym. Environ. 1–10, 2017.

34. Liao, J.C, Deng, J.S., Chiu, C.S., Hou, W.C., Huang, S.S., Shie, P.H., Huang, G.J. Anti-Inflammatory Activities of Cinnamomum cassia Constituents In Vitro and In Vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; 2012.

35. Lin, S.S., Lu, T.M., Chao, P.C., Lai, Y.Y., Tsai, H.T., Chen, C.S., Lee, Y.P., Chen, S.C, Chou, M.C., Yang, C.C. In vivo cytokine modulatory effects of cinnamaldehyde, the major constituent of leaf essential oil from Cinnamomum osmophloeum Kaneh. Phytother Res. P. 1511-1518; 2011.

36. Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y., Ali, M.M., Mcguire, F., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. In vivo. P. 669-684, 2013.

37. Byung, H.U.N., Lee, K.Y.G., Lee, J., Lee, J.Y., Cho, J.Y. Regulatory Effect of Cinnamaldehyde on Monocyte/Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. Mediators of inflammation. V. 2010, p. 529 – 359, 2010.

38. Belviso, S; Ghirardello, D; Giordano, M; Ribeiro, G. S; De souza, A. J; Parodi, S; Risso, S; Zeppa, G; Composição fenólica, capacidade antioxidante e compostos voláteis de licuri Syagrus coronata (Martius) Beccari, afetadas pelo processo tradicional de torrefação. Food Res. Int. 51, p. 39-45; 2013.

39. Castelo Branco, R. A. C. F; De Vasconcelos, C. D. L; Rangel, A. C. C; Cavalcanti, A. E. L; De Araújo, J. M; De Albuquerque, U. P; Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de

plantas nativas e exóticas da Caatinga e da Mata Atlântica selecionadas através de uma pesquisa etnobotânica. Pharm. Biol. v. 50 (2), p. 201-207; 2012.

40. Chalupka, A.N; Talmor, D; The Economics of sepsis. Crit Care Clin, v. 28, p. 57-76, 2012.

41. Byung, H.U.N., Lee, K.Y.G., Lee, J., Lee, J.Y., Cho, J.Y. Regulatory Effect of Cinnamaldehyde on Monocyte/Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. Mediators of inflammation. V. 2010, p. 529 – 359; 2010.

42. Choi, D. Y.; Baek, Y. H.; Huh, J. E.; et al. Stimulatory effect of Cinnamomum cassia and cinnamic acid on angiogenesis through up- regulation of VEGF and Flk-1/KDR expression. In Immunopharmacology; 2009.

43. Croxen, M.A, Law R.J, Scholz, R, Keeney, K. M, Wlodarska, M, Finlay, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews; 26:822– 880; 2013.

44. Dusse, L.M.S, Vieira, L.M, Carvalho, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 2003, 39(4)343:350.

45. Ellis, C.G, Bateman, R.M, Sharpe, M. D, Sibbald, W. J, Gill, R. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O(2) extraction in sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282:H156-H164; 2002.

46. Maciel, M. C. G; Farias, J. C; Maluf, M. J; Gomes, E. A; Pereira, P. V. S; Aragão-Filho, W. C; Frazão, J. B; Costa, G. C; Sousa, S. M; Silva, L. A; Amaral, F. M. M; Russo, M; Guerra, R. N. M; Nascimento, F. R. F; Syzygium jambolanum treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. BMC Complementary and Alternative Medicine. v. 8, p. 57-64; 2008.

47. Munera, D, Ritchie J.M, Hatzios, S. K, Bronson R, Fang G, Schadt, E.E, Davis B.M, Waldor M. K. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4. Nat. Commun. Int. 5:3080; 2014.

48. Rieger, K.A.; Schiffman, J.D. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. Carbohydr. Polym. 113, 561–568; 2014.

49. Sanla-ead, N.; Jangchud, A. Chonhenchob, P. S. V. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films; 2012

51. Z.chai, S. Gatti, C. Toniatti,V. Poli, and T. Bartfai. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1β: a study on IL- 6-deficient mice. Journal of Experimental. Vol. 183, p. 311–316; 1996.

52. Wang, L., Hou, Y., Yi, D., Ding, B., Zhao, D., Wang, Z., Zhu, H., Liu, Y., Gong, J., ASSAAD, H.W.U.G. Beneficial roles of dietary oleum cinnamomi in alleviating intestinal injury. Frontiers in Bioscience. P. 814-828; 2015.

53. Levy, M. M, Evans, L. E, Rhodes, A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle. Intensive Care Med ;44(6):925-28; 2018.

Figuras e Legendas

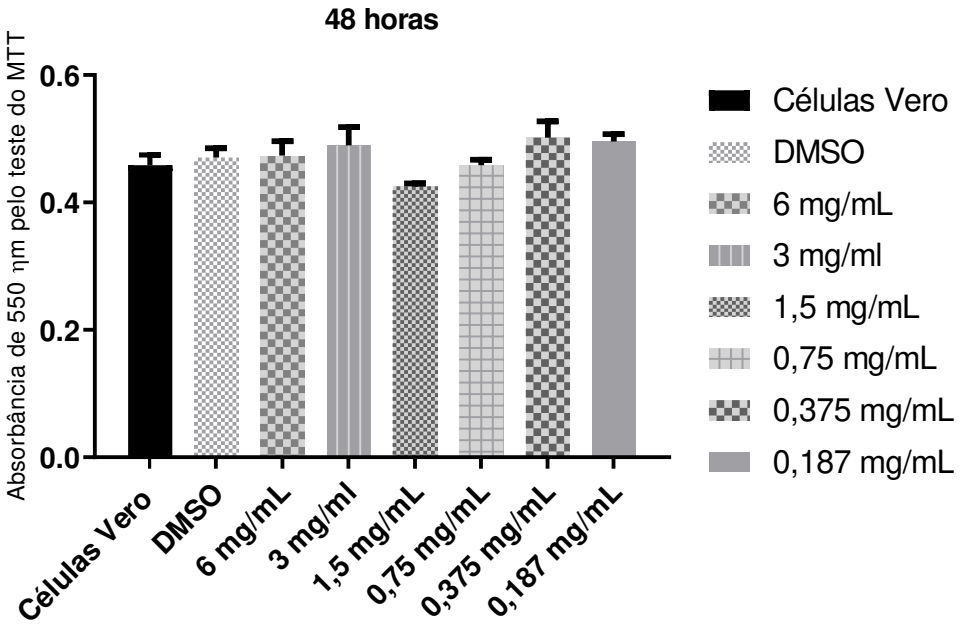

Figura 1: Ensaio de Citotoxidade sobre célula Vero com MTT que marca a viabilidade celular através da atividade mitocondrial. Células Vero foram incubadas com diferentes concentrações de Cinamaldeído (6 mg/mL a 0,187 mg/mL). Após um período de 3 horas, a viabilidade celular foi analisada utilizando o ensaio de MTT.

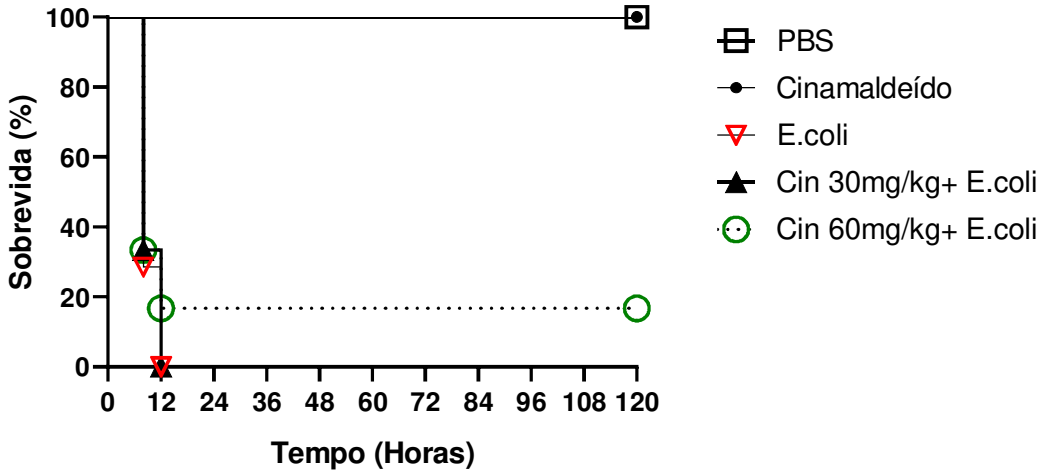

Figura 2: Avaliação da sobrevida dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de *Escherichia coli* produtora da serinoprotease Pic pré-tratados com cinamaldeído. Os animais usados no experimento foram distribuídos em 5 grupos (6 animais/grupo). Os animais dos grupos controlem receberam PBS, Cinamaldeído e injeções contendo 200 µL de inoculo bacteriano. Os demais grupos receberam o pré tratamento com cinamaldeído nas concentrações de 30mg/kg e 60mg/kg e a inoculação de 200 µL de suspensões bacterianas contendo 10^9 UFC/mL.

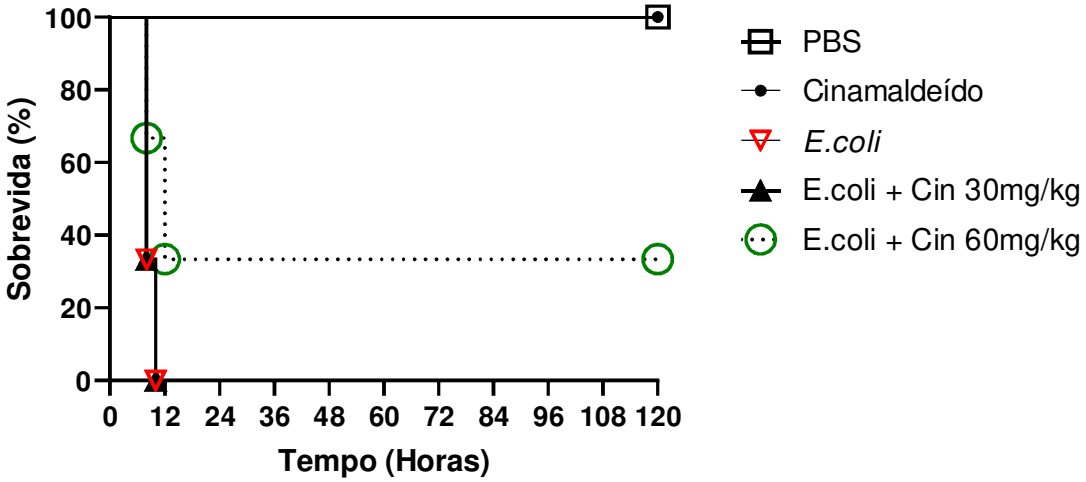

Figura 3: Avaliação da sobrevida dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de *Escherichia coli* produtora da serinoprotease Pic pós-tratados com cinamaldeído. Os animais usados no experimento foram distribuídos em 5 grupos (6 animais/grupo). Os animais dos grupos controlem receberam PBS, Cinamaldeído e injeções contendo 200 µL de inoculo bacteriano. Os demais grupos receberam a inoculação de 200 µL de suspensões bacterianas contendo 10^9 UFC/mL e após 2h receberam o pós-tratamento com cinamaldeído nas concentrações de 30mg/kg e 60mg/kg.

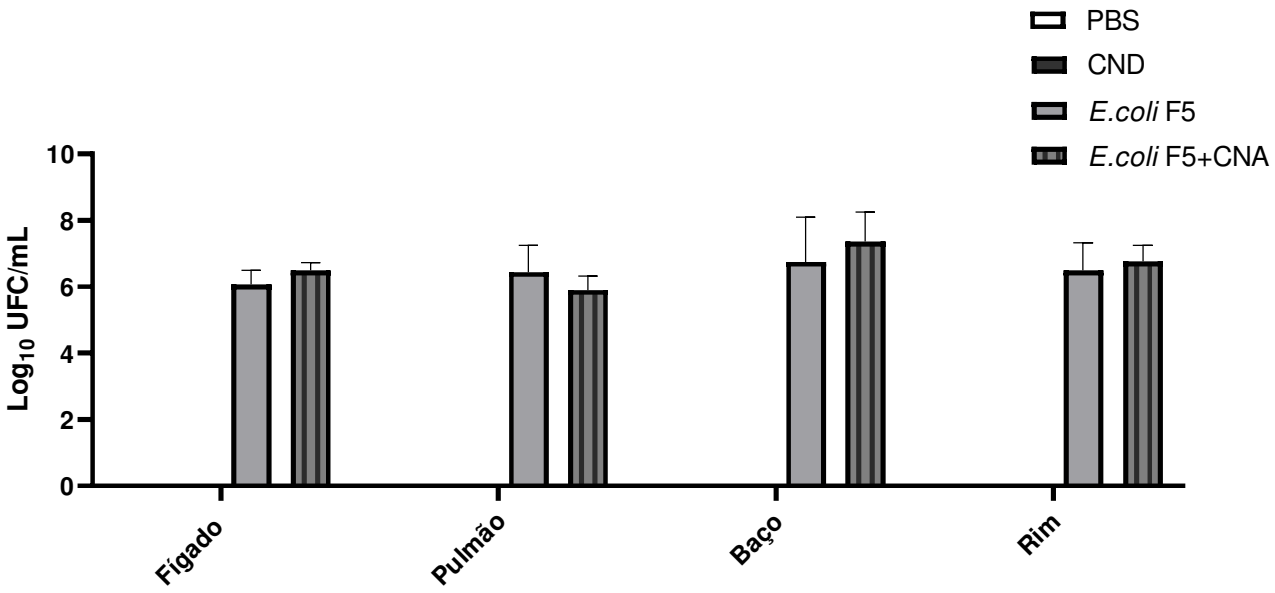

Figura 4: Contagem de UFCs das amostras do fígado, pulmão, baço e rim dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias. **e dos animais controle.** Para avaliação da presença de bactérias nos órgãos, uma parte dos mesmos foi macerada e diluições seriadas, até a concentração de 10-5, foram semeadas em ágar MacConkey. As UFCs foram contadas após incubação *overnight* a 37°C. Os resultados estão expressos como Log de UFC/mL e representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.

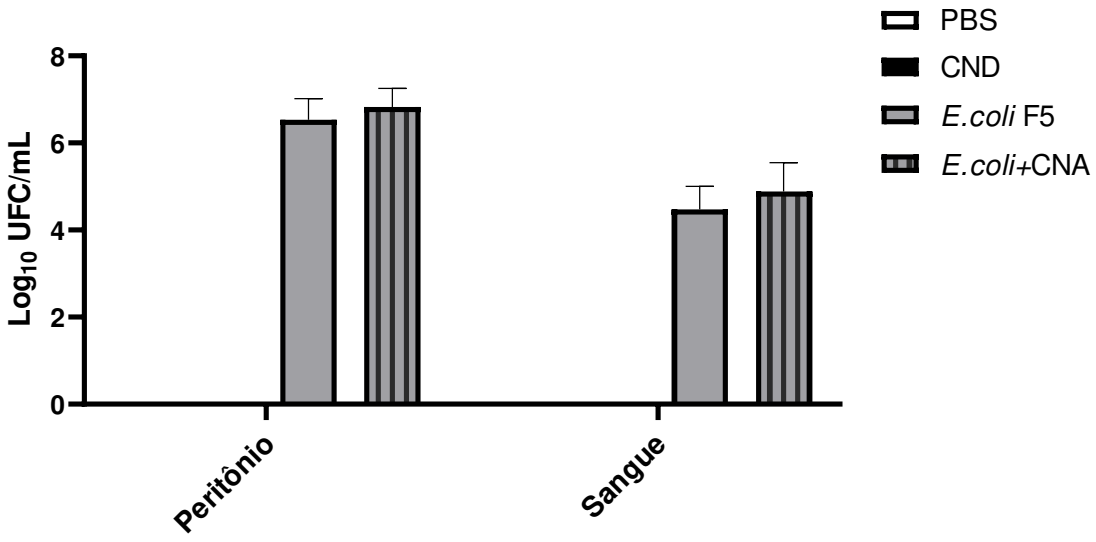

Figura 5: Contagem do número total de células do peritônio dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. As células peritoneais dos animais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 4 mL PBS estéril gelada, coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1 e contadas com auxílio de um hemocitômetro (Sigma, USA), e de um microscópio óptico de luz comum. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.
#p < 0,001 quando comparado com o grupo *E. coli.*

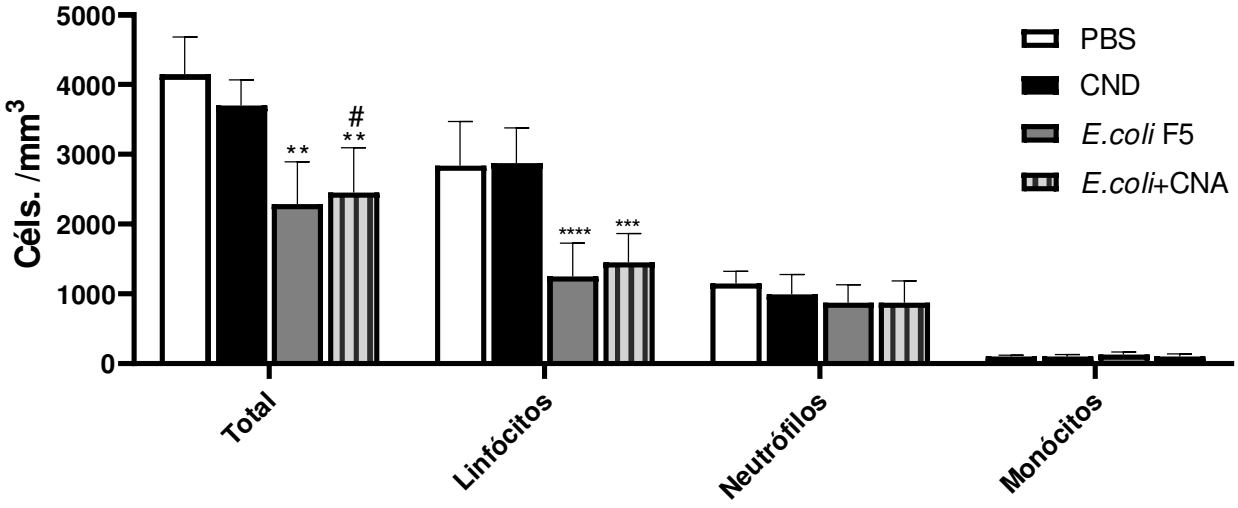

Figura 6. Contagem total e diferencial das células sanguíneas dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. Doze horas após indução da sepse por inoculação peritoneal de bactérias, os animais já anestesiados foram submetidos à punção retro orbital para coleta do sangue destinado a contagem celular total e diferencial (que foi realizada por método automatizado). Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.

\# $p < 0,05$ quando comparado com o grupo PBS.

*** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo PBS.

****$p < 0,0001$ quando comparado com o grupo PBS.

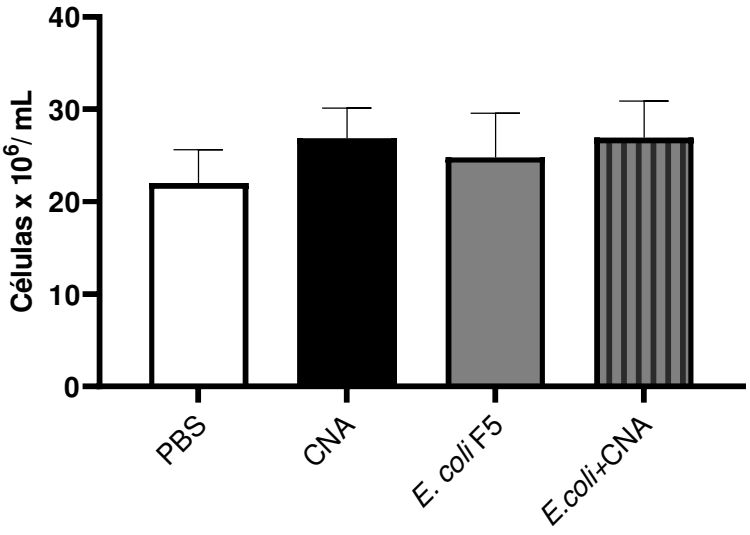

Figura 7: Contagem do número total de células do baço dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. Doze horas após a indução da sepse, as células do baço foram obtidas por meio da remoção e maceração do órgão e adicionado 4mL de PBS. As células foram coradas com cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30% e contadas com auxílio de um microscópio óptico de luz comum. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.

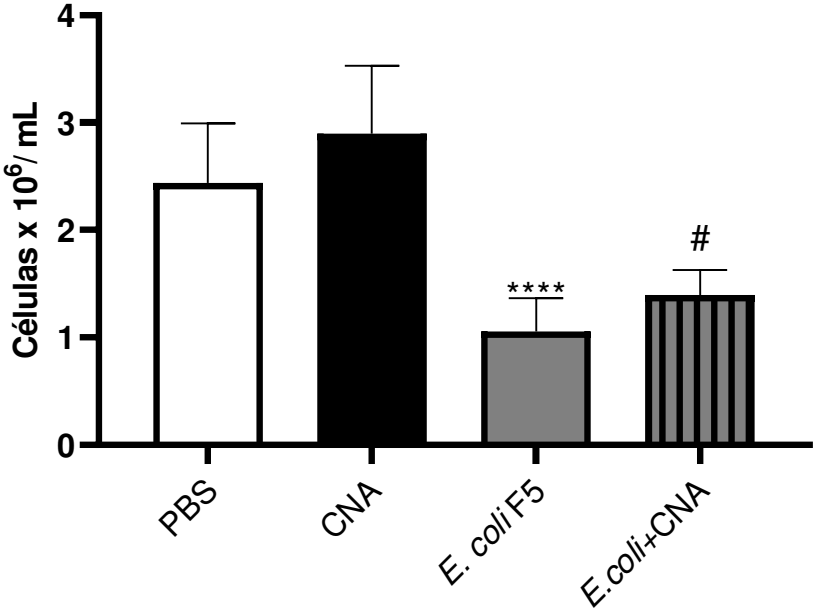

Figura 8. Contagem do número total de células do peritônio dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. Doze horas após a indução da sepse, as células do peritônio foram obtidas por meio da remoção e maceração do órgão e adicionado 4mL de PBS. As células foram coradas com cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30% e contadas com auxílio de um microscópio óptico de luz comum. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.
**** p<0,0001 quando comparado com o grupo CNA
#p <0,05 quando comparado com o grupo *E.coli* F5

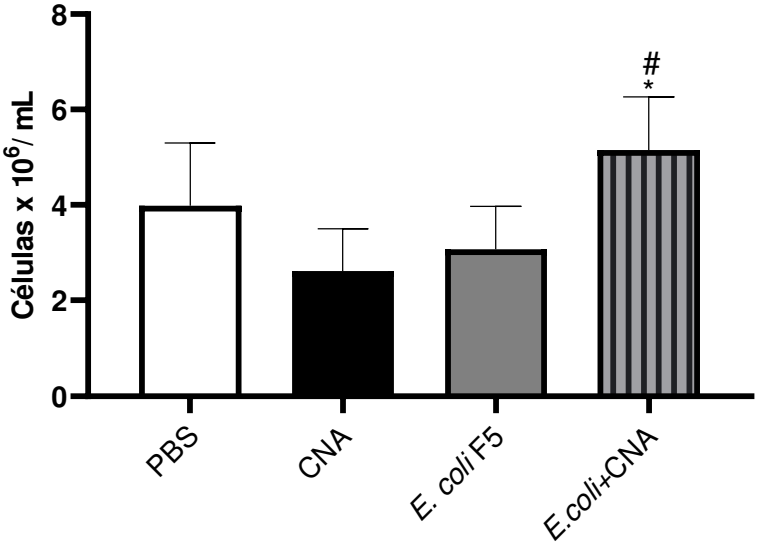

Figura 9. Contagem do número total de células da medula óssea dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controles. Doze horas após a indução da sepse, as células da medula óssea foram obtidas por meio da perfusão do fêmur dos animais com 1 mL de PBS. As células foram coradas com cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30% e contadas com auxílio de um microscópio óptico de luz comum. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.
*p< 0,05 quando comparado com o grupo *E. coli*

#p<0,01 quando comparado com o grupo CNA

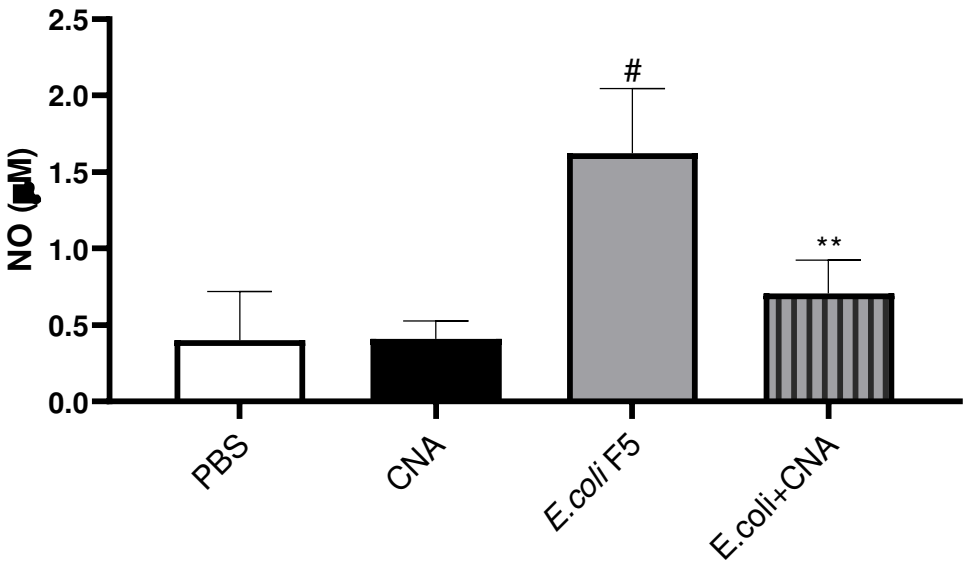

Figura 10. Produção de Óxido Nítrico no sangue dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e de animais controles. Doze horas após a inoculação peritoneal de bactérias, os animais já anestesiados foram submetidos à punção retro orbital para coleta do sangue destinado a mensuração sérica de NO via dosagem de nitrito. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.
** p < 0,05 quando comparado com o grupo *E.coli* F5

#p <0,01 quando comparados com os grupos PBS e CNA

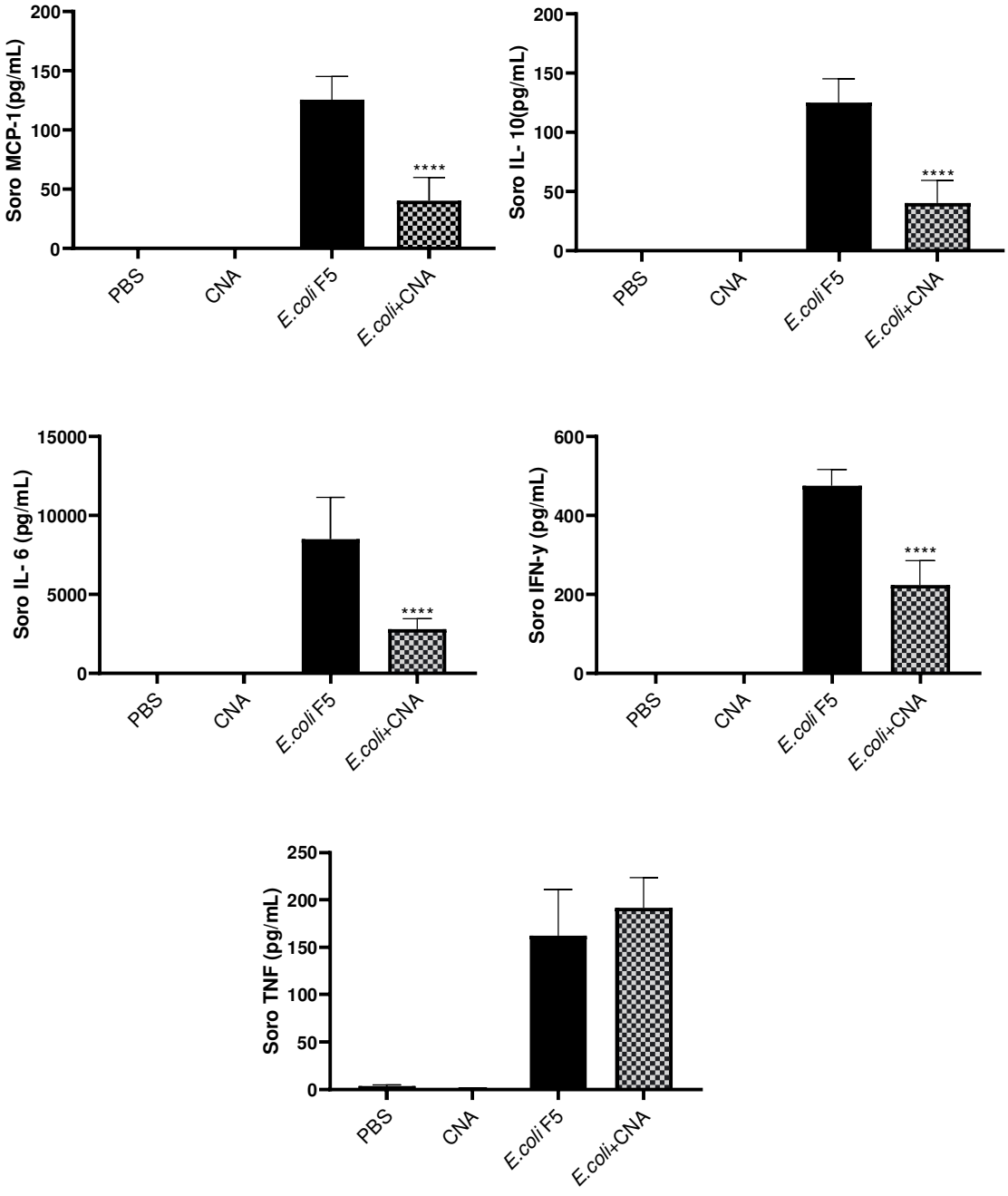

Figura 11. Concentração de citocinas no soro dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. Doze horas após indução da sepse por inoculação peritoneal de bactérias, o sangue foi obtido e centrifugado para obtenção e utilizado para a dosagem de citocinas (IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ) e da quimiocina MCP-1. A quantificação destas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Bead Array) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo recomendações do fabricante. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.
****p < 0,0001 quando comparado com o grupo *E. coli.*

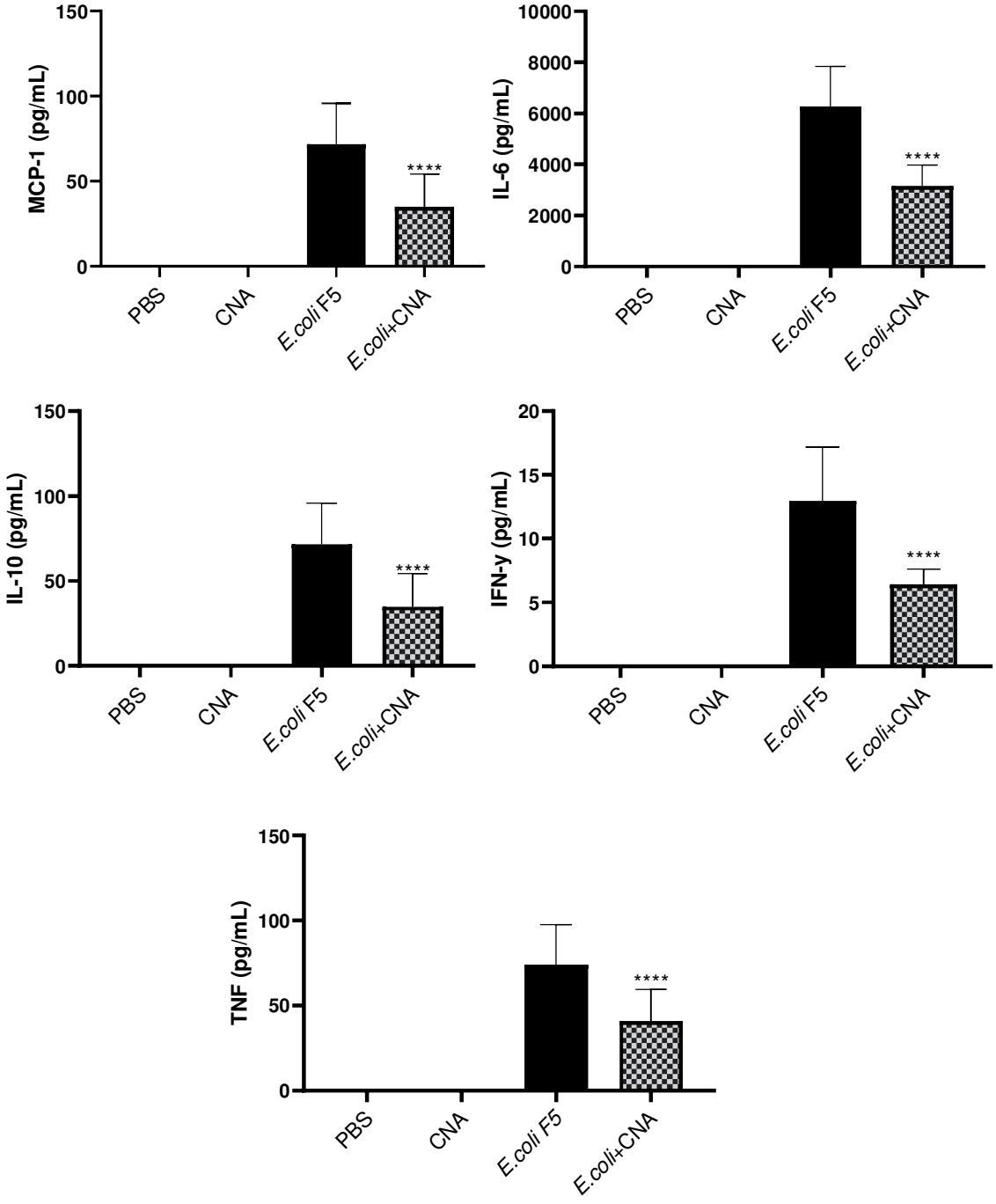

Figura 12. Concentração de citocinas no lavado peritoneal dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. Doze horas após indução da sepse por inoculação peritoneal de bactérias, os lavados peritoneais dos animais foram obtidos e utilizados para a dosagem de citocinas (IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ) e da quimiocina MCP-1. A quantificação destas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Bead Array) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo recomendações do fabricante. Os resultados representam a média ± S.D. de 6 animais por grupo.
****$p < 0,0001$ quando comparado com grupo *E. coli.*

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cinamaldeído promoveu um efeito bactericida e não é toxico para células Vero, e foi possível avaliar a sobrevida de camundongos e determinar que a dose 60mg/kg consegue manter a sobrevida de 33% dos animais com sepse induzida pela inoculação i.p. de *E. coli* produtora da serinoprotease Pic.

Além disso, é evidente no presente trabalho que o CNA demonstrou possíveis potenciais anti-inflamatórias e imunomoduladoras que podem ajudar a controlar e equilibrar esses eventos na sepse. A diminuição/manutenção de alguns tipos celulares como linfócitos no local da infeção, a redução de NO, e a regulação de algumas citocinas podem contribuir de forma positiva no controle dessa síndrome.

Porém, devido à complexidade e interações entre diversos fatores durante o processo de sepse, mais estudos estão em andamento no nosso grupo de pesquisa para que a resposta imune frente a uma infecção ocasionada por bactérias produtoras de Pic seja melhor compreendida.

6. CONCLUSÕES

- O cinamaldeído promoveu um efeito bactericida e não é toxico para células Vero, além disso o tratamento com cinamaldeído aumentou a taxa de sobrevida de animais sépticos;

- O composto em estudo aumentou o número total e diferencial de células do sangue nos animais sépticos e também aumentou a produção de células na medula óssea, sem causar alterações no local do foco inicial de infecção;

- O tratamento com cinamaldeído reduziu de forma significativa a produção de óxido nítrico de animais sépticos;

- Cinamaldeído promoveu uma redução de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro e no peritônio dos animais sépticos.

REFERÊNCIAS

ALBANO, M., ALVES, F. C. B., ANDRADE, B. F. M. T., BARBOSA, L. N., PEREIRA, A. F. M., DE SOUZA, M. D. L. R., ... & JÚNIOR, A. F. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *38*, 83- 90; 2016.

ABREU, AG; ABE, C M, NUNES, KO; MORAES, C. T, CHAVEZ-DUENAS, L; NAVARRO-GARCIA, F; BARBOSA, A. S, PIAZZA, R. M, ELIAS, W. P. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic Escherichia coli. Gutmicrobes. Int. 7:115-125; 2016.

ABREU, A. G; FRAGA, T. R; MARTINEZ; A. P. G; KONDO, M. Y; JULIAN M. A; JULIANO, L; NAVARRO-GARCIA, F; ISAAC, L; BARBOSA, A. S; ELIAS, W. P; The serine protease Pic from enteroaggregative Escherichia coli mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. J. Infect. Dis. int. 212, p. 106-115; 2015.

ANAND, P.; MURALI K.Y.; TANDON, V.; MURTHY, P. S.; CHANDRA, R. Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenol pyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. ChemBiol Interact. Jun 7;186(1):72-81. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.044; 2010

ANDRADES, M.E., MORINA, A., SPASIĆ, S., SPASOJEVIĆ, I. Bench-to-bedside review: Sepsis - from the redox point of view. Critical Care. P. 215:230; 2011.

ANGUS, D. C., LINDE-ZWIRBLE, W. T., LIDICKER, J., et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Critical Care Medicine, p. 1303-1310; 2001.

ASEHNOUNE, K., STRASSHEIM, D., MITRA, S., KIM, J.Y., ABRAHAM, E. Involvement of Reactive Oxygen Species in Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of NF-B1. Journal of Immunology. P. 2522-2529; 2004.

BARROS, L. L. S.; MAIA, C. S. F & MONTEIRO, M. C. Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. *Cad. Saúde Colet*, 24(4), 388-396; 2016

BENJAMIM, C. F; Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. Revista de Medicina de Riberão Preto. v. 34, p. 18-26; 2001.

BENJAMIM, C. F; FERREIRA, S. H; CUNHA, F. Q; Role of oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. J. Infec. Dis. v. 182, p 214-223; 2000.

BENJAMIM, C.F., LUNDY, S.K., LUKACS, N.W., HOGABOAM, C.M., KUNKEL, S.L. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. **Blood.** P. 88-95, 2004.

BOOMER, J.S., JONATHAN, M. GREEN, HOTCHKISS, R.S. The changing immune system in sepsis Is individualized immuno-modulatory therapy the answer?. Virulence. P. 45–56; 2014.

BOSMANN, M., WARD, P.A. The inflammatory response in sepsis. Trends in Immunology. P.129-136; 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: Anvisa; 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia brasileira.5. ed. Brasília: Anvisa, 2v/il. 5 ed. 718-723, 852p; 2010

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. Ciência e Saúde coletiva, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685; 2012.

BYUNG, H.U.N., LEE, K.Y.G., LEE, J., LEE, J.Y., CHO, J.Y. Regulatory Effect of Cinnamaldehyde on Monocyte/Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. Mediators of inflammation. V. 2010, p. 529 – 359; 2010.

CÁRNIO, EC; Novas perspectivas no tratamento do paciente com sepse. Rev. Latino-Am. Enfermagem; vol.27 Ribeirão Preto; Jan 17, 2019.

CASTELO BRANCO, R. A. C. F; DE VASCONCELOS, C. D. L; RANGEL, A. C. C; CAVALCANTI, A. E. L; DE ARAÚJO, J. M; DE ALBUQUERQUE, U. P; Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de plantas nativas e exóticas da Caatinga e da Mata Atlântica selecionadas através de uma pesquisa etnobotânica. Pharm. Biol. v. 50 (2), p. 201-207; 2012.

CHALUPKA, A.N; TALMOR, D; The Economics of sepsis. Crit Care Clin, v. 28, p. 57-76, 2012. BYUNG, H.U.N., LEE, K.Y.G., LEE, J., LEE, J.Y., CHO, J.Y. Regulatory Effect of Cinnamaldehyde on Monocyte/Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. Mediators of inflammation. V. 2010, p. 529 – 359; 2010.

CHEN P., STANOJCIC, M., JESCHKE, M.G. Differences between murine and human sepsis. The surgical clinics of Noth America. P. 1135-1149; 2014.

CHEN, H.; HU, X.; CHEN, E.; WU, S.; MCCLEMENTS, D.J.; LIU, S.; LI, B.; LI, Y. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. Food Hydrocoll.61, 662–671; 2016.

CHOI, D. Y.; BAEK, Y. H.; HUH, J. E.; ET AL. Stimulatory effect of Cinnamomum cassia and cinnamic acid on angiogenesis through up- regulation of VEGF and Flk-1/KDR expression. In Immunopharmacology; 2009.

CHUNG, C. S; SONG, G. Y; LOMAS, J; SIMMS, H. H; CHAUDRY, I. H; AYALA, A; Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity. J. Leukocyte Biol. V. 74, p. 344- 351; 2003.

CROSSARA-ALBERTO, D.P; DARINI, A.L; INOUE, R.Y; SILVA, J.S; FERREIRA, S.H; CUNHA, F; Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by Staphylococcus aureus. Br. J. Pharmacol. v. 136, p. 645–658; 2002.

CROXEN MA, LAW RJ, SCHOLZ R, KEENEY KM, WLODARSKA M, FINLAY BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews; 26:822– 880; 2013.

DAUTIN N; Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATES): biogenesis and function. Toxins. v. 2, P. 1179-1206; 2010

DESHMANE SL, KREMLEV S, AMINI S, SAWAYA BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. Journal of interferon & cytokine research 29(6):313-326; 2009.

DE OLIVEIRA Y. L. C; NASCIMENTO, S. L. C.; DA SILVA, A. G, MACEDO, A. J, ARAÚJO, J. M. D.; CORREIA, M. T. D. S.; SILVA, M. V. D.; Atividade antimicrobiana e rastreio fitoquímico de Buchena via tetraphylla (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretoideae). Scientific World J. int. 849302; 2012.

DEBORAH, J., STEARNS-KUROSAWA, MARCIN, F., OSUCHOWSKI, CATHERINE VALENTINE, SHINICHIRO KUROSAWA, AND DANIEL G. REMICK. The Pathogenesis of Sepsis. Revista anual de patologia. P. 19–48; 2001.

DEJAGER, L; PINHEIRO, I; DEJONCKHEERE, E; LIBERT, C.; Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? Trends in Microbiology. v.19, n.4, p.198-208, 2011.

DODSON G, WLODAWER A. Catalytic triads and their relatives. Trends Biochem; 23:347–352; 1998.

DOMADIA, P. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, *74*(6), 831-840; 2007

DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 39(4)343:350; 2003

DUTRA, I. L.; ARAUJO, L. G. ; ASSUNCAO, R. G. ; LIMA, Y. A. ; NASCIMENTO, J. R. ; VALE, A. A. M. ; ALVES, P. C. S. ; TROVAO, L. O. ; SANTOS, A. C. M. ; SILVA, R. M. ; SILVA, L. A. ; MACIEL, M. C. G. ; SOUSA, E. M. ; ELIAS, W. P. ; NASCIMENTO, F. R. F. ; ABREU, A. G. . Pic-Producing Escherichia coli Induces High Production of Proinflammatory Mediators by the Host Leading to Death by Sepsis. International journal of molecular sciences; 2020.

DUTTA PR, CAPPELLO R, NAVARRO-GARCIA F, NATARO JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. Infect Immun; 70(12):7105–13; 2002.

ELLIS CG, BATEMAN RM, SHARPE MD, SIBBALD WJ, GILL R. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O (2) extraction in sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282:H156-H164; 2002.

EL-SAYED EL-SM, ABD EL-RAOUF OM, FAWZY HM, MANIE MF. Comparative study of the possible protective effects of cinnamic acid and cinnamaldehyde on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Biochemical Molecular Toxicology. P. 508-514; 2013.

FINK M, HEARD S. Laboratory models of sepsis and septic shock. J Surg Res; 49:186-96; 1990.

FREITA R. B; SANTIAGO, M. T; BAHIA, C. P; PEREIRA, L. P; DE MELLO, C. GARRIDO A, DE FIGUEIREDO L, SILVA M. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 19 (2); 2004.

GOMES TAT, ELIAS WP, SCALETSKY ICA, GUTH BEC, RODRIGUES JF, PIAZZARMF, FERREIRA LCS, MARTINEZ MB. Diarrheagenic Escherichia coli. Brazilian Journal of Microbiology; 47:3–30; 2016.

HARDAW, WILLIAMS C, SUN Y. A new approach to the treatment of experimental septic shock. J Surg Res; 61:311-6; 1996.

HARRINGTON, S. M; SHEIKH, J; HENDERSON, I. R; RUIZ-PEREZ, F; COHEN, P. S; NATARO, J. P; The Pic protease of enteroaggregative Escherichia coli promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. Infect. Immun. Int. 77, p. 2465-2473; 2009.

HATTORI Y, HATTORI K, SUZUKI T, MATSUDA N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. Pharmacology & Therapeutics; 177:56-66; 2017.

HEDSTROM L. Serine protease mechanism and specificity. Chem. Rev; 102:4501–4524; 2002.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; WRIGHT, A. V. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46:3590–3595; 1998.

HENDERSON I. R; CZECZULIN, J; ESLAVA, C; NORIEGA, F; NATARO, J. P; Charactezation of Pic, a secreted protease of Shigellaflexneri and enteroagregative Escherichia coli. Infect. Immun. Int. 67:5587-96;1999.

HERZOG K, ENGELER DUSEL J, HUGENTOBLER M, BEUTIN L, SÄGESSER G, STEPHAN R, HÄCHLER H, NÜESCH-INDERBINEN M. Diarrheagenic enteroaggregative Escherichia coli causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. Infection; 42:441-4; 2014.

HO, S.C.; CHANG, K.S.; CHANG, P.W. Inhibition of neuroinflammation by cinnamon and its main components. FoodChem. 138, 2275–2282; 2013.

HOTCHKISS RS, OSMON SB, CHANG KC, WAGNER TH, COOPERSMITH CM, KARL IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathway. The Journal of Immunology; 174:5110-5118; 2005.

HOTCHKISS, R & SKARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348(2), 138-150; 2009.

HUTTUNEN, R., AITTONIEMI, J. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. J Infect, v. 63, n. 6, pp.407-419, 2011.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. Implementação de *Protocolo Gerenciado de Sepse Protocolo Clínico:* Atendimento ao paciente adulto com sepse / choque séptico. São Paulo; 2015.

JOHNSON JR, RUSSO TA. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: “The other bad E. coli”. J Lab Clin Med; 139:155-62; 2002.

KAPER J. B; NATARO J. P; MOBLEY H. L. T; Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology; 2(2):123–140; 2004.

KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol; 11:373-84; 2010.

KIM, B. H.; LEE, Y. G.; LEE, J.; LEE, J. Y.; CHO, J. Y. Regulatory Effect of Cinnamaldehyde on Monocyte/Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. Mediators of Inflammation; 2010.

KIM, M. E.; NA, J. Y.; LEE, J. S. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. Immunopharmacology and Immunotoxicology; 2018

KOGA VL, TOMAZETTO G, CYOIA PS, NEVES MS, VIDOTTO MC, NAKAZATO G, KOBAYASHI RKT. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from human blood culture in Brazil. BioMed Research International; 1-9; 2014.

KWON, H.K., HWANG, J.S., SO J.S., LEE, C.G., SAHOO, A., RYU, J.H., JEON, W.K., KO, B.S., IM, C.R., LEE, S.H., PARK, Z.Y., IM, S.H. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NFkappaB and AP1. BMC Cancer; 2010.

LATIFI, M.A., O'RIORDAN, LEVINE D. Interleukin- 10 controls the onset of irreversible septic shock. Infection and Immunity, vol. 70, p. 4441–4446; 2002.

LAUPLAND, K.B., GREGSON, D.B., CHURCH, D.L., ROSS, T., PITOUT, J.D. Incidence, risk factors and outcomes of Escherichia coli bloodstream infections in a large Canadian region. Clin. Microbiol. Infect; 14(11);1041–1047; 2008.

LEAL, L. B; SOUSA, G. D; SEIXAS, K. B; SOUZA, P. H. N. D; SANTANA, D. P. D; Determinação do balanço hidrofilo-lipófilo crítico do óleo licuri de Syagruscoronata: Aplicação de emulsões tópicas e avaliação de sua função hidratante. Braz. J. Pharm. Sci. v. 49, p. 167-173; 2013.

LE TULZO, Y., C. PANGAULT, A. GACOUIN, V. GUILLOUX, O. TRIBUT, L. AMIOT, P. TATTEVIN, R. THOMAS, R. FAUCHET, AND B. DRENOU. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. Shock; 18:487; 2002.

LEVY MM, EVANS LE, RHODES A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle. Intensive Care Med ;44(6):925-28; 2018.

LIAO, J.C, DENG, J.S., CHIU, C.S., HOU, W.C., HUANG, S.S., SHIE, P.H., HUANG, G.J. Anti-Inflammatory Activities of Cinnamomum cassia Constituents In Vitro and In Vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; 2012.

LIN, S.S., LU, T.M., CHAO, P.C., LAI, Y.Y., TSAI, H.T., CHEN, C.S., LEE, Y.P., CHEN, S.C., CHOU, M.C., YANG, C.C. In vivo cytokine modulatory effects of cinnamaldehyde, the major constituent of leaf essential oil from Cinnamomum osmophloeum Kaneh. Phytother Res. P. 1511-1518; 2011.

LÓPEZ-MATA, M.A.; RUIZ-CRUZ, S.; DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J.; DEL TORO-SÁNCHEZ, C.L.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; SILVA-BELTRÁN, N.P.; CIRA-CHÁVEZ, L.A.;

BURRUEL-IBARRA, S.E. Mechanical, barrier and antioxidant properties of chitosan films incorporating cinnamaldehyde. J. Polym. Environ. 1–10, 2017.

LUAN, Y., DONG, N., XIE, M., XIAO, X., YAO, Y. The Significance and Regulatory Mechanisms of Innate Immune Cells in the Development of Sepsis. Journal of interferon & cytokine research. V. 34; 2014.

M. V; NOGUEIRA, A. C. R; DIAS, A. P; CAPAVERDE, M. R. C; FERRARI, C. V; ANTONIOL, T; Aspectos relevantes da sepse. Revista Científica Fagoc Saúde, v. 1, n. 2; 2016.

MACIEL, M. C. G; FARIAS, J. C; MALUF, M. J; GOMES, E. A; PEREIRA, P. V. S; ARAGÃO-FILHO, W. C; FRAZÃO, J. B; COSTA, G. C; SOUSA, S. M; SILVA, L. A; AMARAL, F. M. M; RUSSO, M; GUERRA, R. N. M; NASCIMENTO, F. R. F; Syzygium jambolanum treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. BMC Complementary and Alternative Medicine. v. 8, p. 57-64; 2008.

MACIEL, M. C. G; FIALHO, E. M. S; GUERRA, R. N. M; BORGES, V. M; KWASNIEWSKI, F. H; NASCIMENTO, F. R.; Tityusserrulatus scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. Toxicon, v. 89, p. 1-8; 2014.

MAINIL J. Escherichia coli virulence factors. Veterinary Immunology and Immunopathology; 152:2–12; 2013

MENDES, S. J. F. Efeito imunomodulador do cinamaldeído no tratamento da sepse induzida em camundongos. (Dissertação) (Dissertação em Biologia Parasitária) – CEUMA, São luís; 2015.

MIAJLOVIC H, SMITH SG. Bacterial self-defence: how Escherichia coli evades serum killing. FEMS MicrobiolLett; 354:1–9; 2014.

MIQUELIN PRS, REIS GR. Comparação entre as taxas de morbimortalidade de pacientes com septicemia em todos os estados da federação e o Distrito Federal. Amazônia Science & Health; 4:420-24; 2016.

MIRANDA, K. M; ESPEY, M; WINK, D. A; A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide: Biol. Chem. v. 5. p. 62-71; 2001.

MORA-RILLO M, FERNÁNDEZ-ROMERO N, NAVARRO-SANFRANCISCO C, DÍEZ-SEBASTIÁN J, ROMERO-GÓMEZ MP, FERNÁNDEZ FA, LÓPEZ JRA, MINGORANCE J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in Escherichia coli bacteremia. Virulence; 6(1):93-100; 2015.

MORITZ, C. M. F. Assessment of antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil combined with EDTA and polyethylene glycol in yogurt. *Acta Scientiarum-Technology,* 99-104; 2015.

MUNERA D, RITCHIE JM, HATZIOS SK, BRONSON R, FANG G, SCHADT EE, DAVIS BM, WALDOR MK. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4. Nat. Commun. Int. 5:3080; 2014.

NEGRAES, P. Guia A-Z de Plantas: condimentos. São Paulo: Bei Comunicação, p.103-106; 2003.

NIELUBOWICZ GR, MOBLEY HL. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. Nat Rev Urol; 7:430-441; 2010

NAVARRO-GARCIA F, GUTIERREZ-JIMENEZ J , GARCIA
TOVAR C , CASTRO LA , SALAZAR -GONZALEZ H , CORDOVA V . Pic, uma proteína autotransportadora secretada por diferentes patógenos da família Enterobacteriaceae, é um potente secretagogo de muco. Infect Immun; 78: 4101 – 9; 2010.

PAGE MJ, Di CERA E. Evolution of peptidase diversity. J. Biol. Chem, 283:30010-14; 2008.

PALOMINO DC, MARTI LC. Quimiocinas e imunidade. Einstein; 13(3):469-73; 2015.

PARKER SJ, WATKINS PE. Experimental models of gram-negative sepsis. Br J Surg; 88:22-30; 2001.

PETER, A. WARD: New approaches to the study of sepsis. EMBO medicina molecular. P. 1234–1243; 2012.

RAJAKUMAR, K; SASAKAWA, C; ADLER, B; Use of a novel approach, termed island probing, identifies the Shigella flexneri she pathogenicity island which encodes a homolog of the Immunoglobulin A protease-like family of proteins. Infect. Immun. Int. 65:4606-14; 1997.

RIBEIRO, M.F; ASSUNÇÃO, M. S. C. DE, CAVALCANTI A. B; JAPIASSÚ A. M; AZEVEDO, L. C. P. DE, OLIVEIRA MIRELLA, C; Chegando a um consenso: vantagens e desvantagens do Sepsis 3 considerando países de recursos limitados. Rev. bras. ter. intensiva. Dec; 28(4): 361-365; 2016.

RIEGER, K.A.; SCHIFFMAN, J.D. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. Carbohydr. Polym. 113, 561–568; 2014.

CEP, ABREU AG, BRAGA FILHO JAF, NASCIMENTO JR, GUERRA RNM, AMARAL FMM, MACIEL MCG, NASCIMENTO FRF. *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. Front Microbiol. p. 8:148, 1-10; 2017.

RITTIRSCH D, HOESEL M, WARD P. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. Journal of Leukocyte Biology Volume 81, January; 2007.

RUIZ-PEREZ, F; NATARO, J. P; Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. Cell. Mol. Life Sci. v.71, p. 745-770; 2014.

RUIZ-PEREZ, F; WAHID, R; FAHERTY, C. S; KOLAPPASWAMY, K; RODRIGUEZ L; SANTIAGO, A; MURPHY, E; CROSS, A; SZTEIN, M. B; NATARO, J.P; Serine protease autotransporters from Shigella flexneri and pathogenic Escherichia coli target a broad range of leukocyte glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. int. 108:12881-6; 2011.

RUIZ GO. Epidemiologia das infecções graves nas unidades de terapia intensiva latino-americanas. Rev. Bras. Ter. Intensiv.; 28 (3): 261-263. http://dx.doi.org/10.5935/0103-507X.20160051; 2016.

RUDIGERA, A., STOTZB, M., SINGER, M. Cellular processes in sepsis. Swiss medical wkly, p. 629–634; 2008.

RUSSO TA, JOHNSON JR. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic Escherichia coli: ExPEC. J Infect Dis; 181:1753-4; 2000

SANLA-EAD, N.; JANGCHUD, A. CHONHENCHOB, P. S. V. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films; 2012

SCHULTE, W., BERNHAGEN, J., BUCALA. R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. Mediators of Inflammation. 16 pages; 2013.

SHANKAR-HARI M, PHILLIPS GS, LEVY ML, SEYMOUR CW, LIU VX, DEUTSCHMAN CS, ANGUS DC, RUBENFELD GD, SINGER M; Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. V.8, p. 315 – 775; 2016;

SHEN, Y., JIA, L., HONMA, N., HOSONO, T., ARIGA, T., SEKI, Y. Beneficial Effects of Cinnamon on the Metabolic Syndrome, Inflammation, and Pain, and Mechanisms Underlying These Effects – A Review. Journal of Traditional and Complementary Medicine. V. 1. p. 27-32; 2012.

SINGER M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. v. 8, p. 315- 801; 2016.

STARR, M., SAITO, H. Sepsis in Old Age: Review of Human and Animal Studies. Aging and Disease. V. 5, p. 126-136; 2014.

STRIZ I, BRABCOVA E, KOLESAR L, SEKERKOVA A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. Clinical Science; 126(9): 593-612; 2014.

TAVARES-MURTA, B. M; MACHADO, J. S; FERREIRA, S.H; CUNHA, F.Q; Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. Inflammation, v.25, p. 247–253; 2001.

TRZECIAK S, DELLINGER RP, PARRILLO JE, GUGLIELMI M, BAJAJ J, ABATE NL, ARNOLD RC, COLILLA S, ZANOTTI S, HOLLENBERG SM. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. Ann Emerg Med; 49:88-98, 2007.

ULETT GC, TOTSIKA M, SCHAALE K, CAREY AJ, SWEET MJ, SCHEMBRI MA. Uropathogenic Escherichia coli virulence and innate immune responses during urinary tract infection. Current Opinion in Microbiology; 16:100–107; 2013.

VAN COILLIE E, VAN DAMME J, OPDENAKKER G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. Cytokine Growth Factor Rev, 10:61–86; 1999.

VILA J, SÁEZ-LÓPEZ E, JOHNSON JR, RÖMLING U, DOBRINDT U, CANTÓN R, GISKE CG, NAAS T, CARATTOLI A, MARTÍNEZ-MEDINA M, BOSCH J, RETAMAR P,

RODRÍGUEZ-BAÑO J, BAQUERO F, SOTO SM. Escherichia coli: an old friend with new tidings. FEMS Microbiol Rev; 40(4):437-463; 2016.

VINCENT JL, ZHANG H, SZABO C, PREISER JC. Effects of nitric oxide in septic shock. Am. J. Respir. Crit. Care Med, 161:17811-1785; 2016.

WANG, L., HOU, Y., YI, D., DING, B., ZHAO, D., WANG, Z., ZHU, H., LIU, Y., GONG, J., ASSAAD, H.W.U.G. Beneficial roles of dietary oleum cinnamomi in alleviating intestinal injury. Frontiers in Bioscience. P. 814-828; 2015.

WANG, Y.; ZHANG, Y. SHI, Y.; PAN, X.; LU, PING, Y. Antibacterial effects of cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) bark essential oil on Porphyromonas gingivalis. Cao. Microbial pathogenesis; 2018.

WARD, P.A. New approaches to the study of sepsis. EMBO Molecular Medicine. P. 1234–1243; 2012.

WEN, P.; ZHU, D.-H.; WU, H.; ZONG, M.-H.; JING, Y.-R.; HAN, S.-Y. Encapsulation of cinnamon essential oil in electros punnano fibrous film for active food packaging. Food Control.59, 366–376; 2016.

WIERSINGA WJ, LEOPOLD SJ, CRANENDONK DR, VAN DER POLL T. Host innate immune responses to sepsis, Virulence; 5(1):36-44; 2014.

WISPLINGHOFF H, BISCHOFF T, TALLENT SM, SEIFERT H, WENZEL RP, EDMOND MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis; 39:309-17; 2014.

YAN, J. J; JUNG, J. S; LEE, J. E; LEE, J; HUH, S. O; KIM, H. S; JUNG, K. C; CHO, J. Y; NAM, J. S; SUH, H. W; Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. Nat. Med. v.10, p.161–167; 2004.

YUAN, X.; HAN, L.; FU, P.; ZENG, H.; LV, C.; CHANG, W.; RUNYON, R. S.; ISHII, M.; HAN, L.; LIU, K.; FAN, T.; ZHANG, W.; LIU. R. Cinnamaldehyde accelerates wound healing by promoting angiogenesis via up-regulation of PI3K and MAPK signaling pathways. Laboratory Investigation; 2017.

Z. CHAI, S. GATTI, C. TONIATTI, V. POLI, AND T. BARTFAI. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1β: a study on IL- 6-deficient mice. Journal of Experimental. Vol. 183, p. 311–316; 1996.

ANEXO I

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – UNIVERSIDADE CEUMA
PROTOCOLO APROVADO - Nº 135/18

ANEXO II

DIRETRIZES PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS NA REVISTA PHARMACEUTICALS

Manuscript Submission Overview

Types of Publications

Pharmaceuticals has no restrictions on the length of manuscripts, provided that the text is concise and comprehensive. Full experimental details must be provided so that the results can be reproduced. *Pharmaceuticals* requires that authors publish all experimental controls and make full datasets available where possible (see the guidelines on Supplementary Materials and references to unpublished data).

Manuscripts submitted to *Pharmaceuticals* should neither been published before nor be under consideration for publication in another journal. The main article types are as follows:

- *Articles:* Original research manuscripts. The journal considers all original research manuscripts provided that the work reports scientifically sound experiments and provides a substantial amount of new information. Authors should not unnecessarily divide their work into several related manuscripts, although Short *Communications* of preliminary, but significant, results will be considered. Quality and impact of the study will be considered during peer review.
- *Reviews:* These provide concise and precise updates on the latest progress made in a given area of research. Systematic reviews should follow the PRISMA guidelines.

Submission Process

Manuscripts for *Pharmaceuticals* should be submitted online at susy.mdpi.com. The submitting author, who is generally the corresponding author, is responsible for the manuscript during the submission and peer-review process. The submitting author must ensure that all eligible co-authors have been included in the author list (read the criteria to qualify for authorship) and that they have all read and approved the submitted version of the manuscript. To submit your manuscript, register and log in to the submission website. Once you have registered, click here to go to the submission form for *Pharmaceuticals*. All co-authors can see the manuscript details in the submission system, if they register and log in using the e-mail address provided during manuscript submission.

Accepted File Formats

Authors must use the Microsoft Word template or LaTeX template to prepare their manuscript. Using the template file will substantially shorten the time to complete copy-editing and publication of accepted manuscripts. The total amount of data for all files must not exceed 120 MB. If this is a problem, please contact the editorial office pharmaceuticals@mdpi.com. Accepted file formats are:

- *Microsoft Word:* Manuscripts prepared in Microsoft Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in Microsoft Word, the *Pharmaceuticals* Microsoft Word template file must be used. Please insert your graphics (schemes, figures, *etc.*) in the main text after the paragraph of its first citation.
- *LaTeX:* Manuscripts prepared in LaTeX must be collated into one ZIP folder (include all source files and images, so that the Editorial Office can recompile the submitted PDF). When preparing manuscripts in LaTeX, please use the *Pharmaceuticals* LaTeX template files. You can now also use the online application writeLaTeX to submit

articles directly to *Pharmaceuticals*. The MDPI LaTeX template file should be selected from the writeLaTeX template gallery.

- *Supplementary files:* May be any format, but it is recommended that you use common, non-proprietary formats where possible (see below for further details).

Cover Letter

A cover letter must be included with each manuscript submission. It should be concise and explain why the content of the paper is significant, placing the findings in the context of existing work and why it fits the scope of the journal. Confirm that neither the manuscript nor any parts of its content are currently under consideration or published in another journal. Any prior submissions of the manuscript to MDPI journals must be acknowledged. The names of proposed and excluded reviewers should be provided in the submission system, not in the cover letter.

Note for Authors Funded by the National Institutes of Health (NIH)

This journal automatically deposits papers to PubMed Central after publication of an issue. Authors do not need to separately submit their papers through the NIH Manuscript Submission System (NIHMS, http://nihms.nih.gov/).

[Return to top]

Manuscript Preparation

General Considerations

- Research manuscripts should comprise:
    - Front matter: Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords
    - Research manuscript sections: Introduction, Results, Discussion, Materials and Methods, Conclusions (optional).
    - Back matter: Supplementary Materials, Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interest, References.
- Review manuscripts should comprise the front matter, literature review sections and the back matter. The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure. Structured reviews and meta-analyses should use the same structure as research articles and ensure they conform to the PRISMA guidelines.
- Case reports should include a succinct introduction about the general medical condition or relevant symptoms that will be discussed in the case report; the case presentation including all of the relevant de-identified demographic and descriptive information about the patient(s), and a description of the symptoms, diagnosis, treatment, and outcome; a discussion providing context and any necessary explanation of specific treatment decisions; a conclusion briefly outlining the take-home message and the lessons learned.
- Graphical abstract: Authors are encouraged to provide a graphical abstract as a self-explanatory image to appear alongside with the text abstract in the Table of Contents. Figures should be a high quality image in any common image format. Note that images displayed online will be up to 11 by 9 cm on screen and the figure should be clear at this size.

- Abbreviations should be defined in parentheses the first time they appear in the abstract, main text, and in figure or table captions and used consistently thereafter.
- SI Units (International System of Units) should be used. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible
- Accession numbers of RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Also see the section on Deposition of Sequences and of Expression Data.
- Equations: If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.
- Research Data and supplementary materials: Note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. Read the information about Supplementary Materials and Data Deposit for additional guidelines.
- Preregistration: Where authors have preregistered studies or analysis plans, links to the preregistration must be provided in the manuscript.
- Guidelines and standards: MDPI follows standards and guidelines for certain types of research. See https://www.mdpi.com/editorial_process for further information.

Front Matter

These sections should appear in all manuscript types

- Title: The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. It should identify if the study reports (human or animal) trial data, or is a systematic review, meta-analysis or replication study. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used.
- Author List and Affiliations: Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, and country. At least one author should be designated as corresponding author, and his or her email address and other details should be included at the end of the affiliation section. Please read the criteria to qualify for authorship.
- Abstract: The abstract should be a total of about 200 words maximum. The abstract should be a single paragraph and should follow the style of structured abstracts, but without headings: 1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; 2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied. Include any relevant preregistration numbers, and species and strains of any animals used. 3) Results: Summarize the article's main findings; and 4) Conclusion: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article: it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.
- Keywords: Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

- Introduction: The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance, including specific hypotheses being tested. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the workand highlight the main conclusions. Keep the introduction comprehensible to scientists working outside the topic of the paper.
- Results: Provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.
- Discussion: Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible and limitations of the work highlighted. Future research directions may also be mentioned. This section may be combined with Results.
- Materials and Methods: They should be described with sufficient detail to allow others to replicate and build on published results. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited. Give the name and version of any software used and make clear whether computer code used is available. Include any pre-registration codes.
- Conclusions: This section is not mandatory, but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.
- Patents: This section is not mandatory, but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

Back Matter

- Supplementary Materials: Describe any supplementary material published online alongside the manuscript (figure, tables, video, spreadsheets, etc.). Please indicate the name and title of each element as follows figure S1: title, Table S1: title, etc.
- Acknowledgments: All sources of funding of the study should be disclosed. Clearly indicate grants that you have received in support of your research work and if you received funds to cover publication costs. Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly and correctly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published.
- Author Contributions: Each author is expected to have made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work; or have drafted the work or substantively revised it; AND has approved the submitted version (and version substantially edited by journal staff that involves the author's contribution to the study); AND agrees to be personally accountable for the author's own contributions and for ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work, even ones in which the author was not personally involved, are appropriately investigated, resolved, and documented in the literature.

For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; Methodology, X.X.; Software, X.X.; Validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; Formal Analysis, X.X.; Investigation, X.X.; Resources, X.X.; Data Curation, X.X.; Writing – Original Draft Preparation, X.X.; Writing – Review & Editing, X.X.; Visualization, X.X.; Supervision, X.X.; Project Administration, X.X.; Funding Acquisition, Y.Y.", please turn to the CRediT taxonomy for the term explanation. For more background on CRediT, see here. "Authorship must include and be limited to those who have contributed substantially to the work. Please read the section concerning the criteria to qualify for authorship carefully".

- Conflicts of Interest: Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the choice of research project; design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. *Pharmaceuticals* does not publish studies funded by the tobacco industry. Any projects funded by pharmaceutical or food industries must pay special attention to the full declaration of funder involvement. If there is no role, please state "The sponsors had no role in the design, execution, interpretation, or writing of the study".
- References: References must be numbered in order of appearance in the text (including table captions and figure legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. We encourage citations to data, computer code and other citable research material. If available online, you may use reference style 9. below.
- Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [ ], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).

The reference list should include the full title, as recommended by the ACS style guide. Style files for Endnote and Zotero are available.

References should be described as follows, depending on the type of work:

- Journal Articles:
  1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* Year, *Volume*, page range.
- Books and Book Chapters:
  2. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; pp. 154–196.
  3. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; Volume 3, pp. 154–196.

- Unpublished work, submitted work, personal communication: 4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. status (unpublished; manuscript in preparation).
- 5. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* stage of publication (under review; accepted; in press). 6. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, Year.
- Conference Proceedings:
- 7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).
- Thesis:
  8. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
- Websites:
- 9. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year). Unlike published works, websites may change over time or disappear, so we encourage you create an archive of the cited website using a service such as WebCite. Archived websites should be cited using the link provided as follows:
- 10. Title of Site. URL (archived on Day Month Year). See the Reference List and Citations Guide for more detailed information.

Preparing Figures, Schemes and Tables

- File for Figures and Schemes must be provided during submission in a single zip archive and at a sufficiently high resolution (minimum 1000 pixels width/height, or a resolution of 300 dpi or higher). Common formats are accepted, however, TIFF, JPEG, EPS and PDF are preferred.
- *Pharmaceuticals* can publish multimedia files in articles or as supplementary materials. Please contact the editorial office for further information.
- All Figures, Schemes and Tables should be inserted into the main text close to their first citation and must be numbered following their number of appearance (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, Table 1, *etc.*).
- All Figures, Schemes and Tables should have a short explanatory title and caption.
- All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but no less than 8 pt. in size. Authors should use the Table option of Microsoft Word to create tables.
- Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color (RGB at 8-bit per channel). There is no additional cost for publishing full color graphics.

Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code

Data Availability

In order to maintain the integrity, transparency and reproducibility of research records, authors must make their experimental and research data openly available either by depositing into data repositories or by publishing the data and files as supplementary information in this journal.

Computer Code and Software

For work where novel computer code was developed, authors should release the code either by depositing in a recognized, public repository or uploading as supplementary information to the publication. The name and version of all software used should be clearly indicated.

Supplementary Material

Additional data and files can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will also be available to the referees as part of the peer-review process. Any file format is acceptable, however we recommend that common, non-proprietary formats are used where possible.

Unpublished Data

Restrictions on data availability should be noted during submission and in the manuscript. "Data not shown" should be avoided: authors are encouraged to publish all observations related to the submitted manuscript as Supplementary Material. "Unpublished data" intended for publication in a manuscript that is either planned, "in preparation" or "submitted" but not yet accepted, should be cited in the text and a reference should be added in the References section. "Personal Communication" should also be cited in the text and reference added in the References section. (see also the MDPI reference list and citations style guide).

Remote Hosting and Large Data Sets

Data may be deposited with specialized service providers or institutional/subject repositories, preferably those that use the DataCite mechanism. Large data sets and files greater than 60 MB must be deposited in this way. For a list of other repositories specialized in scientific and experimental data, please consult databib.org or re3data.org. The data repository name, link to the data set (URL) and accession number, doi or handle number of the data set must be provided in the paper. The journal Data also accepts submissions of data set papers.

Deposition of Sequences and of Expression Data

New sequence information must be deposited to the appropriate database prior to submission of the manuscript. Accession numbers provided by the database should be included in the submitted manuscript. Manuscripts will not be published until the accession number is provided.

- *New nucleic acid sequences* must be deposited in one of the following databases: GenBank, EMBL, or DDBJ. Sequences should be submitted to only one database.
- *New high throughput sequencing (HTS) datasets* (RNA-seq, ChIP-Seq, degradome analysis, …) must be deposited either in the GEO database or in the NCBI's Sequence Read Archive.
- *New microarray data* must be deposited either in the GEO or the ArrayExpress databases.The "Minimal Information About a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines published by the Microarray Gene Expression Data Society must be followed.
- *New protein sequences* obtained by protein sequencing must be submitted to UniProt (submission tool SPIN).

All sequence names and the accession numbers provided by the databases should be provided in the Materials and Methods section of the article.

References in Supplementary Files

Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the reference list of the main text.

Research and Publication Ethics

Research Ethics

Research Involving Human Subjects

When reporting on research that involves human subjects, human material, human tissues, or human data, authors must declare that the investigations were carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975 (https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/), revised in 2013. According to point 23 of this declaration, an approval from an ethics committee should have been obtained before undertaking the research. At a minimum, a statement including the project identification code, date of approval, and name of the ethics committee or institutional review board should be cited in the Methods Section of the article. Data relating to individual participants must be described in detail, but private information identifying participants need not be included unless the identifiable materials are of relevance to the research (for example, photographs of participants' faces that show a particular symptom). Editors reserve the right to reject any submission that does not meet these requirements.

Example of an ethical statement: "All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of XXX (Project identification code)."

A written informed consent for publication must be obtained from participating patients who can be identified (including by the patients themselves). Patients' initials or other personal identifiers must not appear in any images. For manuscripts that include any case details, personal information, and/or images of patients, authors must obtain signed informed consent from patients (or their relatives/guardians) before submitting to an MDPI journal. Patient details must be anonymized as far as possible, e.g., do not mention specific age, ethnicity, or occupation where they are not relevant to the conclusions. A template permission form is available to download. A blank version of the form used to obtain permission (without the patient names or signature) must be uploaded with your submission.

You may refer to our sample form and provide an appropriate form after consulting with your affiliated institution. Alternatively, you may provide a detailed justification of why informed consent is not necessary. For the purposes of publishing in MDPI journals, a consent, permission, or release form should include unlimited permission for publication in all formats (including print, electronic, and online), in sublicensed and reprinted versions (including translations and derived works), and in other works and products under open access license. To respect patients' and any other individual's privacy, please do not send signed forms. The journal reserves the right to ask authors to provide signed forms if necessary.

Ethical Guidelines for the Use of Animals in Research

The editors will require that the benefits potentially derived from any research causing harm to animals are significant in relation to any cost endured by animals, and that procedures followed are unlikely to cause offense to the majority of readers. Authors should particularly ensure that their research complies with the commonly-accepted '3Rs':

- Replacement of animals by alternatives wherever possible,
- Reduction in number of animals used, and
- Refinement of experimental conditions and procedures to minimize the harm to animals.

Any experimental work must also have been conducted in accordance with relevant national legislation on the use of animals for research. For further guidance authors should refer to the Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures [1].

Manuscripts containing original descriptions of research conducted in experimental animals must contain details of approval by a properly constituted research ethics committee. As a minimum, the project identification code, date of approval and name of the ethics committee or institutional review board should be cited in the Methods section.

Pharmaceuticals endorses the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk/ARRIVE) for reporting experiments using live animals. Authors and reviewers can use the ARRIVE guidelines as a checklist, which can be found at www.nc3rs.org.uk/ARRIVEchecklist.

1. Home Office. Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures. Available online: http://www.official-documents.gov.uk/document/hc8889/hc01/0107/0107.pdf.

Research Involving Cell Lines

Methods sections for submissions reporting on research with cell lines should state the origin of any cell lines. For established cell lines the provenance should be stated and references must also be given to either a published paper or to a commercial source. If previously unpublished *de novo* cell lines were used, including those gifted from another laboratory, details of institutional review board or ethics committee approval must be given, and confirmation of written informed consent must be provided if the line is of human origin.

An example of Ethical Statements:

The HCT116 cell line was obtained from XXXX. The $MLH1^{+}$ cell line was provided by XXXXX, Ltd. The DLD-1 cell line was obtained from Dr. XXXX. The DR-GFP and SA-GFP reporter plasmids were obtained from Dr. XXX and the Rad51K133A expression vector was obtained from Dr. XXXX.

Research Involving Plants

Experimental research on plants (either cultivated or wild) including collection of plant material, must comply with institutional, national, or international guidelines. We recommend that authors comply with the Convention on Biological Diversity and the Convention on the Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.

For each submitted manuscript supporting genetic information and origin must be provided. For research manuscripts involving rare and non-model plants (other than, e.g., *Arabidopsis thaliana, Nicotiana benthamiana, Oriza sativa*, or many other typical model plants), voucher specimens must be deposited in an accessible herbarium or museum. Vouchers may be requested for review by future investigators to verify the identity of the material used in the study (especially if taxonomic rearrangements occur in the future). They should include details of the populations sampled on the site of collection (GPS coordinates), date of collection, and document the part(s) used in the study where appropriate. For rare, threatened or endangered species this can be waived but it is necessary for the author to describe this in the cover letter.

Editors reserve the rights to reject any submission that does not meet these requirements.

An example of Ethical Statements:

Torenia fournieri plants were used in this study. White-flowered Crown White (CrW) and violet-flowered Crown Violet (CrV) cultivars selected from 'Crown Mix' (XXX Company, City, Country) were kindly provided by Dr. XXX (XXX Institute, City, Country).

Arabidopis mutant lines (SALKxxxx, SAILxxxx,…) were kindly provided by Dr. XXX , institute, city, country).

Publication Ethics Statement

Pharmaceuticals is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). We fully adhere to its Code of Conduct and to its Best Practice Guidelines.

The editors of this journal enforce a rigorous peer-review process together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, image manipulation, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. The editors of *Pharmaceuticals* take such publishing ethics issues very seriously and are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

Authors wishing to publish their papers in *Pharmaceuticals* must abide to the following:

- Any facts that might be perceived as a possible conflict of interest of the author(s) must be disclosed in the paper prior to submission.
- Authors should accurately present their research findings and include an objective discussion of the significance of their findings.
- Data and methods used in the research need to be presented in sufficient detail in the paper, so that other researchers can replicate the work.
- Raw data should preferably be publicly deposited by the authors before submission of their manuscript. Authors need to at least have the raw data readily available for presentation to the referees and the editors of the journal, if requested. Authors need to ensure appropriate measures are taken so that raw data is retained in full for a reasonable time after publication.
- Simultaneous submission of manuscripts to more than one journal is not tolerated.
- Republishing content that is not novel is not tolerated (for example, an English translation of a paper that is already published in another language will not be accepted).
- If errors and inaccuracies are found by the authors after publication of their paper, they need to be promptly communicated to the editors of this journal so that appropriate actions can be taken. Please refer to our policy regarding publication of publishing addenda and corrections.
- Your manuscript should not contain any information that has already been published. If you include already published figures or images, please obtain the necessary permission from the copyright holder to publish under the CC-BY license. For further information, see the Rights and Permissions page.
- Plagiarism, data fabrication and image manipulation are not tolerated.
    - Plagiarism is not acceptable in *Pharmaceuticals* submissions.

Plagiarism includes copying text, ideas, images, or data from another source, even from your own publications, without giving any credit to the original source.

Reuse of text that is copied from another source must be between quotes and the original source must be cited. If a study's design or the manuscript's structure or language has been inspired by previous works, these works must be explicitly cited.

If plagiarism is detected during the peer review process, the manuscript may be rejected. If plagiarism is detected after publication, we may publish a correction or retract the paper.

- Image files must not be manipulated or adjusted in any way that could lead to misinterpretation of the information provided by the original image.

  Irregular manipulation includes: 1) introduction, enhancement, moving, or removing features from the original image; 2) grouping of images that should obviously be presented separately (e.g., from different parts of the same gel, or from different gels); or 3) modifying the contrast, brightness or color balance to obscure, eliminate or enhance some information.

  If irregular image manipulation is identified and confirmed during the peer review process, we may reject the manuscript. If irregular image manipulation is identified and confirmed after publication, we may correct or retract the paper.

Our in-house editors will investigate any allegations of publication misconduct and may contact the authors' institutions or funders if necessary. If evidence of misconduct is found, appropriate action will be taken to correct or retract the publication. Authors are expected to comply with the best ethical publication practices when publishing with MDPI.

Reviewer Suggestions

During the submission process, please suggest three potential reviewers with the appropriate expertise to review the manuscript. The editors will not necessarily approach these referees. Please provide detailed contact information (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should neither be current collaborators of the co-authors nor have published with any of the co-authors of the manuscript within the last five years. Proposed reviewers should be from different institutions to the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential reviewers. You may suggest reviewers from among the authors that you frequently cite in your paper.

English Corrections

To facilitate proper peer-reviewing of your manuscript, it is essential that it is submitted in grammatically correct English. Advice on some specific language points can be found here.

If you are not a native English speaker, we recommend that you have your manuscript professionally edited before submission or read by a native English-speaking colleague. This can be carried out by MDPI's English editing service. Professional editing will enable reviewers and future readers to more easily read and assess the content of submitted manuscripts. All accepted manuscripts undergo language editing, however an additional fee will be charged to authors if very extensive English corrections must be made by the Editorial Office: pricing is according to the service here

Preprints and Conference Papers

Pharmaceuticals accepts articles that have previously been made available as preprints provided that they have not undergone peer review. A preprint is a draft version of a paper made available online before submission to a journal.

MDPI operates *Preprints*, a preprint server to which submitted papers can be uploaded directly after completing journal submission. Note that *Preprints* operates independently of the journal and posting a preprint does not affect the peer review process. Check the *Preprints* instructions for authors for further information.

Expanded and high quality conference papers can be considered as articles if they fulfil the following requirements: (1) the paper should be expanded to the size of a research article; (2) the conference paper should be cited and noted on the first page of the paper; (3) if the authors do not hold the copyright of the published conference paper, authors should seek the appropriate permission from the copyright holder; (4) authors are asked to disclose that it is conference paper in their cover letter and include a statement on what has been changed compared to the original conference paper. *Pharmaceuticals* does not publish pilot studies or studies with inadequate statistical power.

Authorship

MDPI follows the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) guidelines which state that, in order to qualify for authorship of a manuscript, 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.

Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgements. More detailed guidance on authorship is given by the International Council of Medical Journal Editors (ICMJE).

Any change to the author list should be approved by all authors including any who have been removed from the list. The corresponding author should act as a point of contact between the editor and the other authors and should keep co-authors informed and involve them in major decisions about the publication. We reserve the right to request confirmation that all authors meet the authorship conditions.

Reviewers Recommendation

Authors can recommend potential reviewers. Journal editors will check to make sure there are no conflict of interests before contacting those reviewers, and will not consider those with competing interests. Reviewers are asked to declare any conflicts of interest. Authors can also enter the names of potential peer reviewers they wish to exclude from consideration in the peer review of their manuscript, during the initial submission progress. The editorial team will respect these requests so long as this does not interfere with the objective and thorough assessment of the submission.

Editors and Journal Staff as Authors

Editorial independence is extremely important and MDPI does not interfere with editorial decisions.

Editorial staff or editors shall not be involved in the processing their own academic work. Submissions authored by editorial staff/editors will be assigned to at least two independent outside reviewers . Decisions will be made by other editorial board members who do not have conflict of interests with the author. Journal staff are not involved in the processing of their own work submitted to any MDPI journals.

Conflict of Interests

According to The International Committee of Medical Journal Editors, “Authors should avoid entering into agreements with study sponsors, both for-profit and non-profit, that interfere with authors’ access to all of the study’s data or that interfere with their ability to analyze and interpret the data and to prepare and publish manuscripts independently when and where they choose.”

Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state “The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results”.

Editorial Procedures and Peer-Review

Initial Checks

All submitted manuscripts received by the Editorial Office will be checked by a professional in-house *Managing Editor* to determine whether they are properly prepared and whether they follow the ethical policies of the journal, including those for human and animal experimentation. Manuscripts that do not fit the journal's ethics policy or do not meet the standards of the journal will be rejected before peer-review. Manuscripts that are not properly prepared will be returned to the authors for revision and resubmission. After these checks, the *Managing Editor* will consult the journals’ *Editor-in-Chief* or *Associate Editors* to determine whether the manuscript fits the scope of the journal and whether it is scientifically sound. No judgment on the potential impact of the work will be made at this stage. Reject decisions at this stage will be verified by the *Editor-in-Chief*.

Peer-Review

Once a manuscript passes the initial checks, it will be assigned to at least two independent experts for peer-review. A single-blind review is applied, where authors' identities are known to reviewers. Peer review comments are confidential and will only be disclosed with the express agreement of the reviewer.

In the case of regular submissions, in-house assistant editors will invite experts, including recommendations by an academic editor. These experts may also include *Editorial Board members* and Guest Editors of the journal. Potential reviewers suggested by the authors may also be considered. Reviewers should not have published with any of the co-authors during the

past five years and should not currently work or collaborate with any of the institutions of the co-authors of the submitted manuscript.

Optional Open Peer-Review

The journal operates optional open peer-review: *Authors are given the option for all review reports and editorial decisions to be published alongside their manuscript. In addition, reviewers can sign their review, i.e., identify themselves in the published review reports.* Authors can alter their choice for open review at any time before publication, however once the paper has been published changes will only be made at the discretion of the *Publisher* and *Editor-in-Chief*. We encourage authors to take advantage of this opportunity as proof of the rigorous process employed in publishing their research. To guarantee an impartial refereeing the names of referees will be revealed only if the referees agree to do so, and after a paper has been accepted for publication.

Editorial Decision and Revision

All the articles, reviews and communications published in MDPI journals go through the peer-review process and receive at least two reviews. The in-house editor will communicate the decision of the academic editor, which will be one of the following:

- *Accept after Minor Revisions*:
  The paper is in principle accepted after revision based on the reviewer's comments. Authors are given five days for minor revisions.
- *Reconsider after Major Revisions*:
  The acceptance of the manuscript would depend on the revisions. The author needs to provide a point by point response or provide a rebuttal if some of the reviewer's comments cannot be revised. Usually, only one round of major revisions is allowed. Authors will be asked to resubmit the revised paper within a suitable time frame, and the revised version will be returned to the reviewer for further comments.
- *Reject and Encourage Resubmission*:
  If additional experiments are needed to support the conclusions, the manuscript will be rejected and the authors will be encouraged to re-submit the paper once further experiments have been conducted.
- *Reject*:
  The article has serious flaws, and/or makes no original significant contribution. No offer of resubmission to the journal is provided.

All reviewer comments should be responded to in a point-by-point fashion. Where the authors disagree with a reviewer, they must provide a clear response.

Author Appeals

Authors may appeal a rejection by sending an e-mail to the Editorial Office of the journal. The appeal must provide a detailed justification, including point-by-point responses to the reviewers' and/or Editor's comments. The *Managing Editor* of the journal will forward the manuscript and related information (including the identities of the referees) to the Editor-in-Chief, Associate Editor, or Editorial Board member. The academic editor being consulted will be asked to give an advisory recommendation on the manuscript and may recommend acceptance, further peer-review, or uphold the original rejection decision. A reject decision at this stage is final and cannot be reversed.

In the case of a special issue, the *Managing Editor* of the journal will forward the manuscript and related information (including the identities of the referees) to the *Editor-in-Chief* who will be asked to give an advisory recommendation on the manuscript and may recommend acceptance, further peer-review, or uphold the original rejection decision. A reject decision at this stage will be final and cannot be reversed.

Production and Publication

Once accepted, the manuscript will undergo professional copy-editing, English editing, proofreading by the authors, final corrections, pagination, and, publication on the www.mdpi.com website.

Clinical Trials Registration

Registration

Authors are strongly encouraged to pre-register clinical trials with an international clinical trials register or and to cite a reference to the registration in the Methods section. Suitable databases include clinicaltrials.gov, the EU Clinical Trials Register and those listed by the World Health Organisation International Clinical Trials Registry Platform.

CONSORT Statement

Pharmaceuticals requires a completed CONSORT 2010 checklist and flow diagram as a condition of submission when reporting the results of a randomized trial. Templates for these can be found here or on the CONSORT website (http://www.consort-statement.org) which also describes several CONSORT checklist extensions for different designs and types of data beyond two group parallel trials. At minimum, your article should report the content addressed by each item of the checklist. Meeting these basic reporting requirements will greatly improve the value of your trial report and may enhance its chances for eventual publication.