

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**USO PROFILÁTICO DE EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS
DE *Apis mellifera* (EPP-AF®) REDUZ INFLAMAÇÃO NO
PARÊQUIMA PULMONAR E AUMENTA A EXPECTATIVA DE
VIDA EM CAMUNDONGOS COM SEPSE
DIMÍTRIOS VIDAL DE OLIVEIRA GARBIS**

São Luís
2021

DIMÍTRIOS VIDAL DE OLIVEIRA GARBIS

**USO PROFILÁTICO DE EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS
DE *Apis mellifera* (EPP-AF®) REDUZ INFLAMAÇÃO NO
PARÊQUIMA PULMONAR E AUMENTA A EXPECTATIVA DE
VIDA EM CAMUNDONGOS COM SEPSE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Thiare Silva Fortes Braga

São Luís

2021

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

Vidal de Oliveira Garbis, Dimítrios.

Uso profilático de extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* EPP-AF reduz inflamação no parênquima pulmonar e aumenta a expectativa de vida em camundongos com sepse / Dimítrios Vidal de Oliveira Garbis. - 2021.
49 p.

Coorientador(a): Thiare Silva Fortes Braga.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes Do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2021.

1. Própolis. 2. Pulmão. 3. Sepse. I. Raquel Fernandes Do Nascimento, Flávia. II. Silva Fortes Braga, Thiare. III. Título.

DIMÍTRIOS VIDAL DE OLIVEIRA GARBIS

**USO PROFILÁTICO DE EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS
DE *Apis mellifera* (EPP-AF®) REDUZ INFLAMAÇÃO NO
PARÊNQUIMA PULMONAR E AUMENTA A EXPECTATIVA DE
VIDA EM CAMUNDONGOS COM SEPSE**

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador (nome)
Instituição do Examinador

2º Examinador (nome)
Instituição do Examinador

3º Examinador (nome)
Instituição do Examinador

“A gente é que é pequeno
E a estrelinha é que é grande
Só que ela tá bem longe.”

Elisa Lucinda

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela oportunidade de estudar na UFMA, uma instituição pública capaz de abrigar um universo de conhecimento, instituição esta que me acolheu, me respeitou e me transformou.

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

Durante a minha formação, os professores ligados ao Laboratório de ImunoFisiologia - LIF desempenharam e desempenham funções que me influenciam em todos os campos. A ciência está presente em nossas vidas em todos os momentos e profissionalmente em tudo que fazemos. Em tempos assombrosos de negacionismo científico tê-los como exemplo tem sido fundamental pra construção do “eu profissional”. Dessa forma, eu agradeço ao LIF e aos que o constroem, professores Lucilene, Marcia, Ana Paula, Rosane e Wanderson. Aos hoje mestres do grupo da Sepse, Aluizio, Liana e Patricia, professores de excelência e comprometidos com a ciência. Aos alunos que são a alma do LIF: Douglas, Lilian, Jefferson, Gleycka, Irla, Regis, Victor, Alex e André, vocês são profissionais incríveis. Agradeço ao Johnny e à Thiare por toda a paciência e companheirismo, por terem sempre a palavra para acalmar o coração aflito da Iniciação científica, do TCC até a esta dissertação.

Agradeço também às agências de fomento que financiaram este projeto: FAPEMA e CNPQ e à empresa ApisFlora pela parceria constante no estudo da própolis.

Eu agradeço meus pais por me ensinarem o respeito e a obediência. A juventude faz tudo parecer efêmero, mas a maturidade nos mostra o quão duro foi a construção de um ser. Eu nada seria sem as instruções firmes, silenciosas, muitas vezes com o olhar do meu pai e os ensinamentos diários da minha mãe. Obrigado pelo lar, pela família e pela educação, o caminho nem sempre foi de flores, mas sempre foi um caminho feliz, porque sempre estivemos juntos, grandes, eu, vocês, Geórgia e Silvana.

Por fim, agradeço e dedico esse trabalho ao Miguel pessoa que mais me inspira e me ensina, dono de uma inteligência ímpar e humildade infinita, não poderia ser agraciado com melhor companheiro de vida e de sonhos. Obrigado por tudo!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Sepses.....	3
2.2 Dados epidemiológicos da Sepses	10
2.3 Imunopatologia da sepsis	11
2.4 Modelos experimentais de sepsis	16
2.5 Terapia para Sepsis.....	18
2.6 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	19
2.7 Potencial biológico da própolis	20
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Extrato de Própolis Padronizado (EPP-AF®)	24
4.2 Animais.....	24
4.3 Indução da sepsis por Ligadura e perfuração cecal (CLP)	24
4.4. Delineamento experimental.....	25
4.5. Avaliação da sobrevivência dos animais.....	26
4.6. Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC)	26

4.7 Obtenção e contagem das células da medula óssea e células peritoneais	26
4.8 Histopatológico.....	27
4.9 Análise estatística	27
5. RESULTADOS	27
5.1 O EPP-AF® aumenta a sobrevivência de camundongos com sepse letal induzida por CLP...27	27
5.2 O EPP-AF® não altera o número de Unidades formadoras de colônia em camundongos com sepse letal induzida por CLP.	28
5.3 O EPP-AF® não altera a celularidade da medula óssea e do sangue em camundongos com sepse letal induzida por CLP.	30
5.4 O EPP-AF® altera o número de células peritoneais em camundongos com sepse letal induzida por CLP.....	31
5.5. O EPP-AF® não altera os parâmetros de coagulação de camundongos com sepse letal induzida por CLP.....	31
5.6. O EPP-AF® altera a inflamação no foco primário da infecção e inibe a inflamação no pulmão de camundongos com sepse letal induzida por CLP.	32
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	49
ANEXO I.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATB	Antibiótico
BAL	Lavado broncoalveolar
BPM	Batimentos por minuto
C	Celsius
CAPE	Éster feniletil do ácido cafeíco (do inglês <i>Caffeic acid phenethyl ester</i>)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	Ligadura e perfuração cecal (do inglês <i>Cecal Ligadure and Puncture</i>)
CLR	Receptores de lectina do tipo C
CSS	Campanha de Sobrevivência à Sepse (do inglês <i>Surviving Sepsis Campaign</i>)
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (do inglês <i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DCs	Células dendríticas (do inglês <i>dendritic cells</i>)
DE	Departamento de emergência
DRC	Doença renal crônica
eGFR	Taxa de filtração glomerular estimada (do inglês <i>estimated glomerular filtration rate</i>)
EHR	Prontuário eletrônico clínico
EPP-AF®	Extrato Padronizado de Própolis de <i>Apis mellifera</i>
EPP10	Extrato Padronizado de Própolis na dose de 10 mg/kg
EPP100	Extrato Padronizado de Própolis na dose de 100 mg/kg
EUA	Estados Unidos da América
FiO ₂	Fração Inspirada de O ₂
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano do tipo DR do inglês <i>Human Leukocyte Antigen – DR isotype</i>
ICD	Classificação Internacional de Doenças
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina

ILS	Aumento percentual no tempo de vida (do inglês <i>increase in life span</i>)
IRp	Insuficiência respiratória
kPa	Quilopascal
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófagos (do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MHC-II	Complexo principal de Histocompatibilidade Classe II (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex class II</i>)
ML/min	Mililitro por minuto
mmHg	Milímetro de mercúrio
MODS	Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
MDSCs	Células mieloides supressoras (do inglês <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>)
MST	Tempo médio de sobrevivência (do inglês <i>median survival time</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NEWS	Pontuação nacional de alerta precoce (do inglês <i>National Early Warning Score</i>)
NLR	Nucleotídeo receptor
O ₂	Oxigênio
OVA	Ovoalbumina
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PAI-1	Inibidor ativador plasminogênico (do inglês <i>plasminogen activator inhibitor</i>)
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês <i>pattern recognition receptors</i>)
qSOFA	<i>quickSOFA</i>
RFC	Razão funcional capilar
RLRs	Receptores indizíveis pelo ácido retinóico
RNI	Relação normatizada internacional

Rpm	Rotações por minuto
SARS-COV2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (do inglês <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
SpO ₂	Saturação do oxigênio no sangue
TF	Fator tecidual (do inglês <i>tissue factor</i>)
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta (do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>)
TLR	Receptor tipo Toll (do inglês <i>Toll-like Receptor</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>)
TTP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UACR	Proporção urinária de albumina a creatina (do inglês <i>Urine Albumin-to-Creatinine Ratio</i>)
uCr	Creatinina urinária do inglês <i>urinary creatinine excretion</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UTI	Unidade de terapia intensiva
VNI	Ventilação não invasiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Critérios e respectivas pontuações para o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment).	6
Tabela 2. Definição de sepse no decorrer dos anos	7
Tabela 3. Pontuação Nacional de alerta precoce (do inglês Nacional Early Warning Score (NEWS))	9
Tabela 4. Expectativa de vida de animais com sepse letal induzida por CLP e que receberam profilaxia com EPP-AF® (EPP10 e EPP100) 6 horas antes da CLP.	28
Tabela 5. Efeito do tratamento profilático com própolis sobre a inflamação no ceco e pulmão de animais com sepse induzida por CLP.	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogenese do choque. _____	13
Figura 2. A resposta do hospedeiro à infecção e durante a sepse. _____	14
Figura 3. Modelos experimentais de sepse. _____	17
Figura 4. Quadro de boas práticas no uso de antibioticoterapia em quadros de sepse _____	19
Figura 5 Indução de sepse pelo modelo CLP _____	25
Figura 6. Sobrevida de animais com sepse letal induzida por CLP. _____	28
Figura 7. Efeito do tratamento profilático com Própolis (EPP-AF®) sobre as Unidades formadoras de Colônia (CFU) em animais com sepse induzida por CLP. _____	29
Figura 8. Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do sangue periférico. _____	30
Figura 9. Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do lavado peritoneal. _____	31
Figura 10. Efeito do tratamento profilático com Própolis nas plaquetas, TAP, TTPA, RNI. _____	32
Figura 11. Efeito do tratamento profilático com EPP-AF® em animais com sepse induzida por CLP. _____	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS).....	4
Quadro 2. Critérios clínicos do score quickSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment).....	8

RESUMO

A própolis é um material balsâmico resinoso, utilizado para a proteção da colmeia contra insetos e microorganismos. Além das atividades antimicrobianas da própolis, destaca-se o seu efeito anti-inflamatório e imunomodulador. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF®) na sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Inicialmente, para avaliação da sobrevida, camundongos Swiss foram separados em 5 grupos: SHAM (sem perfuração cecal), CLP (Salina+CLP), CLP+ATB (Antibiótico+CLP), EPP10 (EPP-AF® 10mg/kg+CLP), EPP100 (EPP-AF® 100mg/kg+CLP). A administração, por via subcutânea, de antibiótico ou EPP-AF®, foi realizada 6 horas antes do procedimento de CLP. A sobrevida dos animais foi avaliada a cada 12 horas, durante 5 dias. Os dados demonstraram um aumento de 51%, 16% e 25% da expectativa de vida dos animais dos grupos CLP+ATB, EPP10 e EPP100, respectivamente, em relação ao grupo CLP. Após a avaliação da sobrevida, foram repetidos os grupos CLP e o EPP100 para avaliação de parâmetros imunofisiológicos. Após 12 horas da CLP, os animais foram eutanasiados e o material biológico foi coletado para devidas análises. Os dados demonstraram que a administração única de EPP-AF®, de forma profilática, não alterou as unidades formadoras de colônia no peritônio, sangue e pulmão, nem a contagem de células do sangue periférico, da medula e coagulograma (número de plaquetas, TTP e TTPA). Entretanto, a contagem de células do peritônio foi menor no grupo tratado assim como o infiltrado inflamatório e hemorragia no tecido pulmomar nos animais que receberam EPP-AF®. Deste modo, conclui-se que o EPP-AF® na concentração de 100mg/kg, quando usado profilaticamente, promoveu melhor preservação do parênquima pulmonar, o que pode explicar o aumento da expectativa de vida apresentado pelos camundongos com sepse induzida por CLP.

Palavras-chaves: Própolis; Pulmão; Sepse; Inflamação

ABSTRACT

Propolis is a resinous balsamic material, used to protect the hive against insects and microorganisms. In addition to the antimicrobial activities of propolis, its anti-inflammatory and immunomodulatory effect stands out. The aim of this study was to evaluate the effect of treatment with Standardized Propolis Extract (EPP-AF®) on sepsis induced by ligation and cecal perforation (CLP). Initially, for survival assessment, Swiss mice were separated into 5 groups: SHAM (without cecal perforation), CLP (Saline + CLP), CLP + ATB (Antibiotic + CLP), EPP10 (EPP-AF® 10mg / kg + CLP), EPP100 (EPP-AF® 100mg / kg + CLP). Subcutaneous administration of antibiotics or EPP-AF® was performed 6 hours before the CLP procedure. Animal survival was assessed every 12 hours for 5 days. The data showed an increase of 51%, 16% and 25% in the life expectancy of animals in the CLP + ATB, EPP10 and EPP100 groups, respectively, in relation to the CLP group. After assessing survival, the CLP and EPP100 groups were repeated to assess immunophysiological parameters. After 12 hours of CLP, the animals were euthanized, and the biological material was collected for proper analysis. The data demonstrated that the single administration of EPP-AF®, prophylactically, did alter neither the colony-forming units in the peritoneum, blood and lung, nor the peripheral blood, marrow and coagulogram cell count (number of platelets, Prothrombin time and Activated partial thromboplastin time). However, the peritoneum cell count as well as the inflammatory infiltrate and hemorrhage in the lung tissue were lower in the animals that received EPP-AF®. Thus, it was possible to conclude that EPP-AF® at a concentration of 100mg / kg, when used in a prophylactically way, promoted better preservation of the lung parenchyma, which may explain the increase in lifespan presented by mice with CLP-induced sepsis.

Keywords: Propolis; Lung; Sepsis; Inflammation

1. Introdução

A sepse é compreendida como um conjunto de anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas induzidas por uma infecção não controlada e que pode levar à síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS) e à morte (SEYMOUR et al., 2016). Esta foi considerada a segunda maior causa de morte entre pacientes internados em UTIs não coronarianas e é a décima causa de mortalidade no quadro geral (AJROUCHE et al., 2013). Porém, acredita-se que esses números sejam subestimados visto a ausência de uma base de dados em países em desenvolvimento (FLEISCHMANN et al., 2016). Devido a sua alta mortalidade e elevados custos, a sepse é uma das maiores preocupações de saúde pública, com gastos que atingiram 20 bilhões de dólares nos Estados Unidos, em 2011 (SINGER et al., 2016).

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome clínica associada à disfunção respiratória, sendo a complicação mais comum da sepse e com mortalidade que varia de aproximadamente 50% (HERRIDGE et al., 2003) a 26% (ERICKSON et al., 2009). A fisiopatologia da LPA descrita por Chung et al., (2003) envolve inflamação com dano alveolar difuso, aumento da permeabilidade capilar, edema intersticial e alveolar, influxo de células inflamatórias circulantes e formação de membranas hialinas.

Rojas et al. (2005) usaram o modelo experimental murino com administração de endotoxina bacteriana gram-negativa lipopolissacarídeo (LPS), modelo animal que se aproxima à sepse em várias espécies. Ao avaliarem o histopatológico após a indução de LPA, os autores observaram que após 6 horas da administração de endotoxina havia congestão e infiltração de células inflamatórias que pareciam ser, predominantemente, neutrófilos. Eles verificaram ainda que após 24 horas da administração de LPS havia mais inflamação e espessamento septal e, após 48 horas, as alterações estavam resolvidas, embora um número maior de neutrófilos ainda estivesse presente.

A compreensão da complexidade do quadro clínico e suas complicações, bem como a terapêutica, vem sofrendo mudanças ao longo dos anos com a avaliação de novas evidências, contudo, as evoluções nas definições de sepse e choque séptico têm evidenciado a busca de uma abordagem precoce que melhore o prognóstico e tratamento para os pacientes acometidos (SINGER et al., 2016).

Atualmente, importantes sociedades médicas que estudam a sepse recomendam como principal diretriz de tratamento para pacientes com quadro de sepse, o início precoce da antibioticoterapia de largo espectro (FERRER et al., 2014; LEVY et al., 2018). Contudo, Kumar

et al., (2009) relataram que o uso de antibióticos de amplo espectro requer uma abordagem adequada uma vez que pode causar danos consideráveis aos pacientes, incluindo eventos adversos e complicações com risco de vida devido à resistência antimicrobiana.

Os modelos padronizados de sepse experimental contribuíram notoriamente para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa doença nas últimas décadas. Em adição, esse conhecimento tem permitido o desenvolvimento de estudos por novas estratégias terapêuticas, a fim de diminuir a mortalidade por essa síndrome. Dessa forma, iniciou-se a busca por uma classe de medicamentos de efeitos adversos ausentes ou minimizados atuem de forma imunomoduladora e que diminuam a inflamação exacerbada como a que ocorre durante a sepse (KWAK et al., 2000).

Neste contexto, a própolis, um material balsâmico, capaz de proteger a colmeia frente aos agentes agressores, como fungos, bactérias, vírus, insetos, dentre outros, tornou-se alvo de interesse na pesquisa de processos infecciosos sistêmicos. De modo geral, estão presentes na composição da própolis compostos flavonoides, como quercetina, aromadendrina, pinocembrina, compostos fenólicos, com destaque para o artepellina C, baccharina e drupanina. Em adição, a própolis verde apresenta ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico, benzoico (DA SILVA LEITAO et al., 2004; HU et al., 2005; SILVEIRA et al., 2021).

Em modelo de inflamação granulomatosa adaptado em nosso laboratório, Machado et al. (2012) mostraram que os animais que receberam o tratamento com extrato de própolis verde tiveram redução de edema do granuloma e aumento de leucócitos, além disso, ao avaliarem o efeito sistêmico em sítio pulmonar, observaram que os animais que receberam o tratamento com a própolis verde tiveram aumento significativo de macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar (BAL) quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento. Tendo em vista estes resultados, Machado et al. (2012) induziram a inflamação pulmonar por instilação de LPS e observaram uma diminuição de células totais no lavado Broncoalveolar (BAL) dos animais tratados com própolis. Estes resultados mostraram que o extrato foi capaz de modular a resposta inflamatória por meio do recrutamento celular no local da infecção, reduzindo o número de neutrófilos, os quais poderiam ser danosos para o tecido pulmonar (HENDERSON, 2005). Utilizando o mesmo extrato de própolis verde, Silveira et al., (2021) mostraram um importante efeito de redução de lesão renal aguda e lesão pulmonar em ratos com sepse induzida por CLP, além de redução de células e citocinas inflamatórias nos rins e pulmão dos animais com sepse.

Tendo em vista os trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório e por outros pesquisadores parceiros, somados à literatura sobre o assunto, a hipótese do presente trabalho conduz à identificação de que o EPP-AF® seria capaz de mudar a história natural da sepse induzida por CLP em camundongos se usado de forma profilática em um tempo condizente com a profilaxia de antibiótico em caso de uma cirurgia intestinal.

Dessa forma, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar o efeito do uso profilático de EPP-AF® na evolução do quadro de sepse, em modelo de sepse experimental induzido por ligadura e perfuração cecal.

2. Referencial teórico

2.1 Sepse

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

Evidentemente, a sepse permanece um grande desafio, tanto para os cientistas quanto para o manejo clínico. Com elevada taxa de mortalidade, 20-30%, as limitações sobre o conhecimento da fisiopatologia da doença por vezes levaram a condutas equivocadas (RANIERI et al., 2012).

A fim de definir critérios clínicos para um diagnóstico precoce, prevenção e redução da mortalidade, especialistas se reuniram em 1991 para elaborarem o primeiro consenso que deu ênfase ao processo contínuo de severidade da síndrome, com um quadro evolutivo de sepse, evoluindo para sepse severa induzida por hipotensão e choque séptico, o estágio mais grave (GEROULANOS e DOUKA, 2006). Neste consenso foi estabelecida a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), visando desenvolver critérios clínicos para identificação do quadro séptico (BONE et al., 1992). Os critérios foram desenvolvidos para facilitar o

diagnóstico proporcionando uma intervenção clínica precoce, visto que isso aumentaria a sobrevivência. Dessa forma determinaram que: temperatura corporal maior que 38C° ou menor que 36C°, frequência cardíaca maior que 90bpm, frequência respiratória maior que 20 rpm ou sinais de hiperventilação identificado por uma PaCO2 menor que 32mmHg, alterações na contagem dos leucócitos numa faixa maior que 12.000 ou menor que 4.000 cel/mm3 ou a presença de 10% de neutrófilos imaturos (Quadro 1). Com 2 desses critérios mais uma cultura positiva ou um foco infeccioso caracteriza-se a sepse (BONE et al., 1992).

Quadro 1. Critérios de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)			
Temperatura corporal	Frequência Cardíaca	Frequência respiratória / Hiperventilação	Leucócitos
>38C ou <36C	>90	> 20 rpm PaCO2 < 32mmHg	>12.000 cel/m3 ou < 4.000 cel/mm3 ou 10% de neutrófilos imaturos

Fonte: Adaptado de (BONE et al., 1992).

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

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

Anteriormente, dois critérios de SIRS com a presença do agente infeccioso caracterizavam a sepse. O novo consenso admite que a sepse envolve resposta pró-inflamatória

e anti-inflamatória do hospedeiro e que fatores ambientais também influenciam. Geroulanos e Douka (2006), para falarem da influência que fatores externos exerciam sobre a doença, propuseram uma comparação semelhante a um canal de comunicação, no qual o organismo, em nível celular e molecular, seria o canal de comunicação e as citocinas, por sua vez, seriam as mensagens transmitidas, formando assim, um complexo sistema que reage de forma diferente a estímulos semelhantes.

Além disso, questionava-se a alta sensibilidade e baixa especificidade dos critérios de SIRS para o diagnóstico de sepse, visto que diversos outros quadros como traumas e queimaduras desenvolviam quadro clínico semelhante e outros pacientes em franca falência orgânica que não apresentam critérios para SIRS, demonstrando sua ineficiência no diagnóstico (SEYMOUR et al., 2016).

O Sepsis-3 delimitou também a definição de choque séptico, colocando-o como um subconjunto de anormalidades consequentes do metabolismo circulatório e celular que aumentam a mortalidade. Nesta ocasião foi enfatizado também o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), um sistema de pontuação amplamente utilizado em Unidades de Terapia Intensiva para avaliar disfunção orgânica e prognóstico como um importante parâmetro para avaliar pacientes sépticos (SINGER et al., 2016) (Tabela 1).

Um resumo das mudanças de definições e critérios pode ser observado melhor na Tabela 2.

Tabela 1 Critérios e respectivas pontuações para o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). O SOFA avalia parâmetros como respiração, coagulação, fígado, função cardiovascular, sistema nervoso central e rins. Para cada parâmetro são dispostos critérios e sinais que são atribuídos de uma determinada pontuação que varia de 0 a 4. Quanto maior for a pontuação do paciente no SOFA, maior será a probabilidade de morte.

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

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

^a Adaptado de Vincent, (2015)

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

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

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

Tabela 2. Definição de sepse no decorrer dos anos

<p>Sepse 1 – 1991 Síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS): resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de insultos clínicos graves:</p> <p>Temperatura > 38 ° C ou < 36 ° C;</p> <p>frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto; frequência respiratória > 20 respirações por minuto ou PaCO₂ < 32 mmHg;</p> <p>e contagem de glóbulos brancos > 12.000 / cu mm, < 4000 / cu mm ou > 10% de formas imaturas (banda)</p> <p>Sepse é uma resposta sistêmica à infecção, manifestada por dois ou mais dos critérios SIRS como resultado da infecção.</p> <p>Sepse grave: sepse associada a disfunção orgânica, hipoperfusão,</p> <p>ou hipotensão; as anormalidades de hipoperfusão e perfusão podem incluir, entre outras, acidose láctica, oligúria ou alteração aguda do estado mental</p> <p>Choque séptico: induzido por sepse, com hipotensão apesar de adequada</p> <p>ressuscitação hídrica juntamente com a presença de anormalidades na perfusão que podem incluir, mas não se limitam a acidose láctica, oligúria ou</p> <p>uma alteração aguda no estado mental; os pacientes que estão recebendo agentes inotrópicos ou vasopressores podem não estar hipotensos no momento em que as anormalidades da perfusão são medidas (BONE et al., 1992).</p>	<p>Sepse 2 – 2001 Infecção: documentada ou suspeita e algumas das seguintes opções. Parâmetros gerais:</p> <p>Febre (temperatura central > 38,3 ° C); hipotermia (temperatura central < 36 ° C); frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto ou > 2 DP acima do valor normal para a idade; taquipnéia: frequência respiratória > 30 respirações por minuto; Estado mental alterado; edema significativo ou balanço hídrico positivo (> 20mL.kg – 1 durante 24h)</p> <p>Hiperglicemia (glicose plasmática > 110mg/dL-1 ou 7,7mM/L-1) na ausência de diabetes</p> <p>Parâmetros inflamatórios: Leucocitose (contagem de glóbulos brancos > 12.000 / µL); leucopenia (contagem de glóbulos brancos < 4000 / µL); contagem normal de glóbulos brancos com > 10% de formas imaturas; proteína C reativa ao plasma > 2 DP acima do valor normal; e procalcitonina plasmática > 2 DP acima do valor normal.</p> <p>Parâmetros hemodinâmicos:</p> <p>Hipotensão arterial (pressão arterial sistólica < 90mmHg, PAM < 70mmHg ou diminuição da pressão arterial sistólica > 40 mmHg em adultos ou < 2 DP abaixo do normal para a idade, saturação venosa mista de oxigênio > 70%, índice cardíaco > 3,5 L.min – 1 m – 2) Parâmetros de disfunção orgânica:</p> <p>Hipoxemia arterial (PaO₂ / FIO₂ < 300); oligúria aguda (débito urinário < 0,5 mL.kg-1 h-1 ou 45 mL L-1 para</p> <p>pelo menos 2 h); aumento da creatinina > 0,5 mg dL – 1; anormalidades da coagulação (razão normalizada internacional > 1,5 ou tempo de tromboplastina parcial ativada > 60 s);</p> <p>íleo (sons intestinais ausentes);</p> <p>trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100.000 µL – 1) Hiperbilirrubinemia (bilirubina total plasmática > 4 mg dL – 1 ou 70 mmol L – 1)</p> <p>Parâmetros de perfusão tecidual:</p> <p>Hiperlactatemia (> 3 mmol L-1); diminuição do enchimento capilar ou manchas (LEVY et al., 2003)</p>	<p>Sepse 3 – 2016 A sepse é uma disfunção orgânica com risco de vida causada pela resposta desregulada do hospedeiro à infecção.</p> <p>Critérios clínicos para sepse:</p> <p>Infecção suspeita ou documentada e um aumento agudo de ≥ 2 pontos SOFA (Tabela 2)</p> <p>A força-tarefa considerou que os critérios positivos de qSOFA (SOFA rápido) também deveriam levar em consideração possíveis infecções em pacientes não reconhecidos anteriormente como infectados.</p> <p>Critérios qSOFA:</p> <p>Estado mental alterado (GCS</p> <p>pontuação < 15);</p> <p>pressão arterial sistólica < 100 mmHg;</p> <p>frequência respiratória > 22 respirações por min</p> <p>O choque séptico é definido como um subconjunto de sepse no qual as anormalidades subjacentes do metabolismo circulatório e celular são profundas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade.</p> <p>O choque séptico pode ser identificado com um construto clínico de sepse com hipotensão persistente, exigindo terapia vasopressora para elevar a MAP > 65 mm</p> <p>Hg e lactato > 2 mmol L-1 (18 mg dL-1), apesar da ressuscitação adequada de fluidos (SINGER et al., 2016).</p>
---	---	---

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

Quadro 2. Critérios clínicos do score quickSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment)

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

Fonte: Adaptado de American Medical Association, 2016.

O escore do qSOFA foi originalmente validado, em 2016, como mais útil em pacientes com suspeita de sepse fora da unidade de terapia intensiva (UTI) (RHEE et al., 2017). Desde então, tem se estudado prospectivamente em vários contextos, incluindo o departamento de emergência (DE) e a UTI apresentando dados conflitantes sobre sua capacidade de diagnosticar com precisão ou prever o risco de morte nessas populações. Além disso, os dados que descrevem seu desempenho comparativo com outros preditores de mortalidade, como critérios de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ou pontuação nacional de alerta precoce (NEWS), também são conflitantes.

Tabela 3. Pontuação Nacional de alerta precoce (do inglês Nacional Early Warning Score (NEWS))

PARÂMETROS	3	2	1	0	1	2	3
FISIOLOGICOS							
Nível de				A	V, D ou NR		
Consciência							
Temperatura	≤ 35	35,1 – 36,0		36,1 – 38,0	38,1 – 39,0	≥ 39,0	
Frequência Cardíaca	≤ 40	41 - 50		51 - 90	91 - 110	111 - 130	≥ 131
PA Sistólica	≤ 90	91-100	101 - 110	111 - 219			≥ 220
Frequência Respiratória	≤ 8	9 - 11		12 - 20		21 - 24	≥ 25
Saturação de O ₂	≤ 91	92-93	94 - 95	≥ 96			
Qualquer suplementação de O ₂	Sim			Não			

Legenda: 1) Nível de consciência (AVPU): **Alerta (A):** O paciente está completamente acordado (embora não necessariamente orientado). Tais pacientes terão espontaneidade na abertura dos olhos, responderá à voz (embora possa estar confuso) e terá função motora preservada. **Voz (V):** O paciente tem algum tipo de resposta quando estimulado verbalmente, podendo responder com os olhos, com a voz ou por movimentos (por exemplo, olhos do paciente abertos ao serem perguntados, “Você está bem?”). A resposta pode ser pequena, como um grunhido, um gemido ou um ligeiro movimento de um membro quando solicitado pela voz. **Dor (D):** O paciente tem resposta a um estímulo de dor. Se o paciente não está alerta e não tem resposta a voz, provavelmente exibirá resposta retirada a dor ou mesmo flexão ou extensão involuntária dos membros ao estímulo doloroso. A pessoa ao realizar a avaliação deve sempre ter cuidado a ser adequadamente treinada quando usar um estímulo doloroso. A pessoa ao realizar a avaliação deve sempre ter cuidado a ser adequadamente treinada quando usar um estímulo dor como método de avaliação dos níveis de consciência. **Não responde (NR):** isso também é comumente referido como “inconsciente”. Este resultado é registrado se o paciente não exibe resposta voz ou a dor pelo olhar, pela voz ou por movimento. **Obs: Aparecimento de nova confusão mental:** como indicado acima, um paciente pode estar confuso, mas alerta. Assim, a avaliação da confusão não faz parte da AVPU. No entanto, novo início ou agravamento da confusão deve sempre suscitar preocupação com causas subjacentes potencialmente graves e justificar urgentemente avaliação clínica. 2) **Insuficiência Respiratória:** Pacientes em IRp Crônica, onde a suplementação de O₂ é crônica e níveis menores SpO₂ podem ser aceitos, deverão ser avaliados por especialistas, e novos critérios poderão ser definidos no escore especificamente para o paciente em questão. Paciente com necessidade de altas frações de O₂ e VNI apresentam risco clínico levado e devem ser monitorados continuamente. (Adaptado do NHS, NEWS Score, 2016)

A pontuação agregada representa o risco de morte por sepse e indica a urgência da resposta:

- 0 a 4 - baixo risco (uma pontuação de 3 em qualquer parâmetro individual é baixo-médio)
- 5 a 6 - risco médio
- 7 ou mais - alto risco

Em resumo, o qSOFA pode não ser tão robusto quanto se pensava inicialmente e os médicos precisam ter em mente que ele foi originalmente projetado não como uma ferramenta de diagnóstico, mas como uma ferramenta preditiva que calcula o risco de morte por sepse. Em metanálise recente em que se compara o qSOFA com os critérios de SIRS, concluiu-se que os critérios de SIRS foram significativamente superiores para o diagnóstico de sepse e o qSOFA teve melhores resultados quando avaliada a mortalidade (SERAFIM et al., 2018), evidenciando a dificuldade na elaboração de um protocolo capaz de identificar precocemente os pacientes suscetíveis a sepse assim como avaliar o prognóstico desses pacientes.

2.2 Dados epidemiológicos da Sepse

A sepse é a segunda causa de morte entre pacientes internados em UTIs não coronarianas e é a décima causa de mortalidade no geral (AJROUCHE et al., 2013). Porém, acredita-se que esses números sejam subestimados visto a ausência de uma base de dados em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (FLEISCHMANN et al., 2016). Estima-se que entre os anos de 1995 e 2015, por estudos com dados de países desenvolvidos, a incidência de casos de sepse foi de 437 casos para cada 100.000 habitantes ao ano. (FLEISCHMANN et al., 2016). Nos Estados Unidos, entre 2005 e 2014, a cada 1000 pacientes admitidos para internação hospitalar, 18,6 tinham critérios clínicos para sepse e a mortalidade foi de 51%, dados esses similares à Classificação Internacional de Doenças (ICD 9ª edição).

Por outro lado, um estudo de 2017 registra taxas estáveis de sepse entre 2009 e 2014 (RHEE et al., 2017). Este estudo utilizou dados do prontuário eletrônico clínico (EHR) de 7 milhões de hospitalizações em 409 hospitais dos EUA e comparou-o com a análise tradicional baseada em declarações (Classificação Internacional de Doenças, Nona Revisão, códigos de modificação clínica para sepse grave ou choque séptico) e revisão direta do prontuário. Foi estimado que, usando dados baseados no prontuário eletrônico (EHR), as taxas de internação por sepse permaneceram inalteradas durante o período do estudo em 6%, enquanto a mortalidade hospitalar diminuiu em 3%. Em contrapartida, análises baseadas em declarações sugeriram um aumento de 10% na incidência e uma redução de 7% na mortalidade. Quando comparado com a revisão direta de prontuários (considerado o método mais sensível de detecção de incidência) de 510 casos selecionados aleatoriamente, estimou-se que as análises baseadas em prontuário eletrônico 20% dos casos não atendiam os critérios de sepse, enquanto a análise baseada em declarações não atendia em 40%. Em metanálise de 10 estudos foi relatado

que a SIRS foi superior ao qSOFA para o diagnóstico de sepse, mas o qSOFA foi um melhor preditor de mortalidade hospitalar (SERAFIM et al., 2018).

Os motivos para um possível aumento da número de casos de sepse incluem fatores como idade avançada, imunossupressão e infecção multirresistente, assim como, protocolos para detecção de sepse precoce e campanhas agressivas de educação e conscientização sobre sepse, muito embora essa hipótese não seja comprovada (KAUKONEN et al., 2014).

Outro fator que influencia na incidência de sepse é o fator sazonal, uma vez que há maior incidência de casos durante o inverno, provavelmente, devido à prevalência de infecções respiratórias (DANAI et al., 2007).

Nos Estados Unidos, de 1979 a 1987, houve o predomínio de bactérias gram-negativas causadores de sepse. No corte subsequente, de 1988 a 2000, houve o predomínio de 52,1% de infecções por gram-positivas, 37,6% por gram-negativas, 4,7% por polimicrobianos, 1% por anaeróbicos e 4,6% por fungos (MARTIN et al., 2003).

Em um estudo em Unidades de Terapia Intensiva envolvendo 14.000 pacientes, foi constatado que das culturas positivas, 62% eram gram-negativas, 47% eram gram-positivas e 19% eram fungos. Dentre as gram-positivas foram encontrados mais frequentemente *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Já entre as gram-negativas, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Pseudomonas aeruginosa* foram os principais agentes etiológicos na cultura (SEYMOUR et al., 2016; VINCENT, 2015).

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

2.3 Imunopatologia da sepse

A sepse descreve uma síndrome clínica complexa que resulta de uma resposta prejudicial do hospedeiro à infecção que se desenvolve quando a resposta inicial apropriada do hospedeiro a uma infecção torna-se amplificada e, em seguida, desregulada (SINGER et al., 2016). Clinicamente, o início é frequentemente insidioso: as características podem incluir febre, confusão mental, hipotensão transitória, diminuição do débito urinário ou trombocitopenia inexplicada. Se não tratado, o paciente pode desenvolver insuficiência respiratória ou renal,

anormalidades de coagulação e hipotensão profunda e sem resposta a volume e drogas vasoativas (SEYMOUR et al., 2016). O conhecimento da trajetória da resposta do hospedeiro durante a sepse é limitado visto que na maioria dos estudos que investigam a disfunção imunológica, as primeiras medições foram feitas no momento da admissão na unidade de terapia intensiva (UTI) e, portanto, não fornecem informações sobre a direção e o curso do tempo da resposta do hospedeiro antes o reconhecimento clínico da doença grave (TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

Inicialmente, o microorganismo é reconhecido pelo sistema imune inato do hospedeiro por uma ligação entre os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) presentes na sua membrana e uma variedade de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) presentes na membrana das células do hospedeiro. Na maioria dos casos, a resposta imune inata elimina o microorganismo, mas, às vezes, ele evade aos mecanismos microbicidas e a resposta do hospedeiro pode se tornar desequilibrada e prejudicial (ANGUS e VAN DER POLL, 2013). Em pacientes com sepse, o sistema imune sai da homeostase em duas direções opostas, mostrando sinais tanto de inflamação excessiva quanto de imunossupressão, cuja extensão varia entre os indivíduos que se agravam devido ao estímulo constante causado pela liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que podem ativar muitos dos PRRs que, por sua vez, também reconhecem os PAMPs, dando origem a um ciclo vicioso que envolve ativação imunológica sustentada e disfunção orgânica (DENNING et al., 2019).

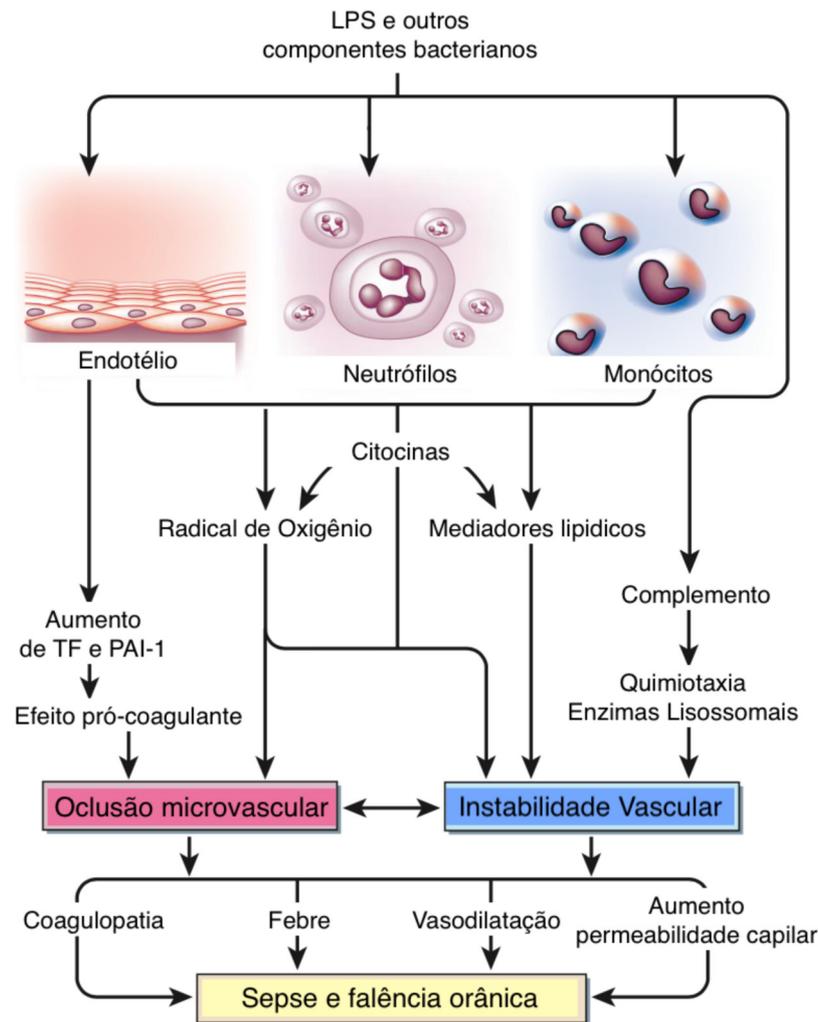


Figura 1. Patogênese do choque. O lipopolissacarídeo (LPS) e outros componentes microbianos ativam simultaneamente várias cascatas paralelas que contribuem para a fisiopatologia da síndrome do desconforto respiratório do adulto (SDRA) e choque. A combinação de baixa contratilidade miocárdica, tônus vascular periférico comprometido e oclusão microvascular leva à hipoperfusão do tecido e oxigenação inadequada e, portanto, à falência de órgãos. Adaptado (LEVY et al., 2003).

Embora os neutrófilos contribuam, claramente, para a inflamação induzida pela sepse, eles também apresentam características disfuncionais que prejudicam suas capacidades antimicrobianas. Os principais achados na sepse são a apoptose tardia dos neutrófilos e o aparecimento de neutrófilos imaturos no sangue periférico, que apresentam déficits nas funções efetoras antimicrobianas, incluindo capacidade de ruptura oxidativa. Pacientes com sepse têm um número aumentado de Células mieloides supressoras (MDSC), que são células mieloides imaturas que podem impedir resposta imune adequada, particularmente, a função das células T auxiliares (ANGUS e VAN DER POLL, 2013; DENNING et al., 2019). A supressão imunológica envolve os sistemas inato e adaptativo e é caracterizada pelo apoptose de células T, células B e células dendríticas (DCs). O esgotamento de células T, a expansão de células T

reguladoras e populações de MDSC) e a reprogramação de células apresentadoras de antígenos levam à redução da expressão de HLA-DR e uma capacidade diminuída de produzir citocinas pró-inflamatórias (DENNING et al., 2019).

A similaridade entre as reações inflamatórias induzidas por diferentes patógenos e aquelas provocadas por diferentes tipos de lesão, infecciosas ou não infecciosas, podem ser explicadas pela interação entre os PRRs com diversos PAMPs e DAMPs, caminho comum destas reações (Figura 1). Devido ao rápido reconhecimento e melhores cuidados terapêuticos e de suporte, muitos pacientes com sepse sobrevivem nos primeiros dias após a admissão na UTI e desenvolvem uma doença crítica crônica que foi denominada inflamação persistente e imunossupressão (ANGUS e VAN DER POLL, 2013; DENNING et al., 2019).

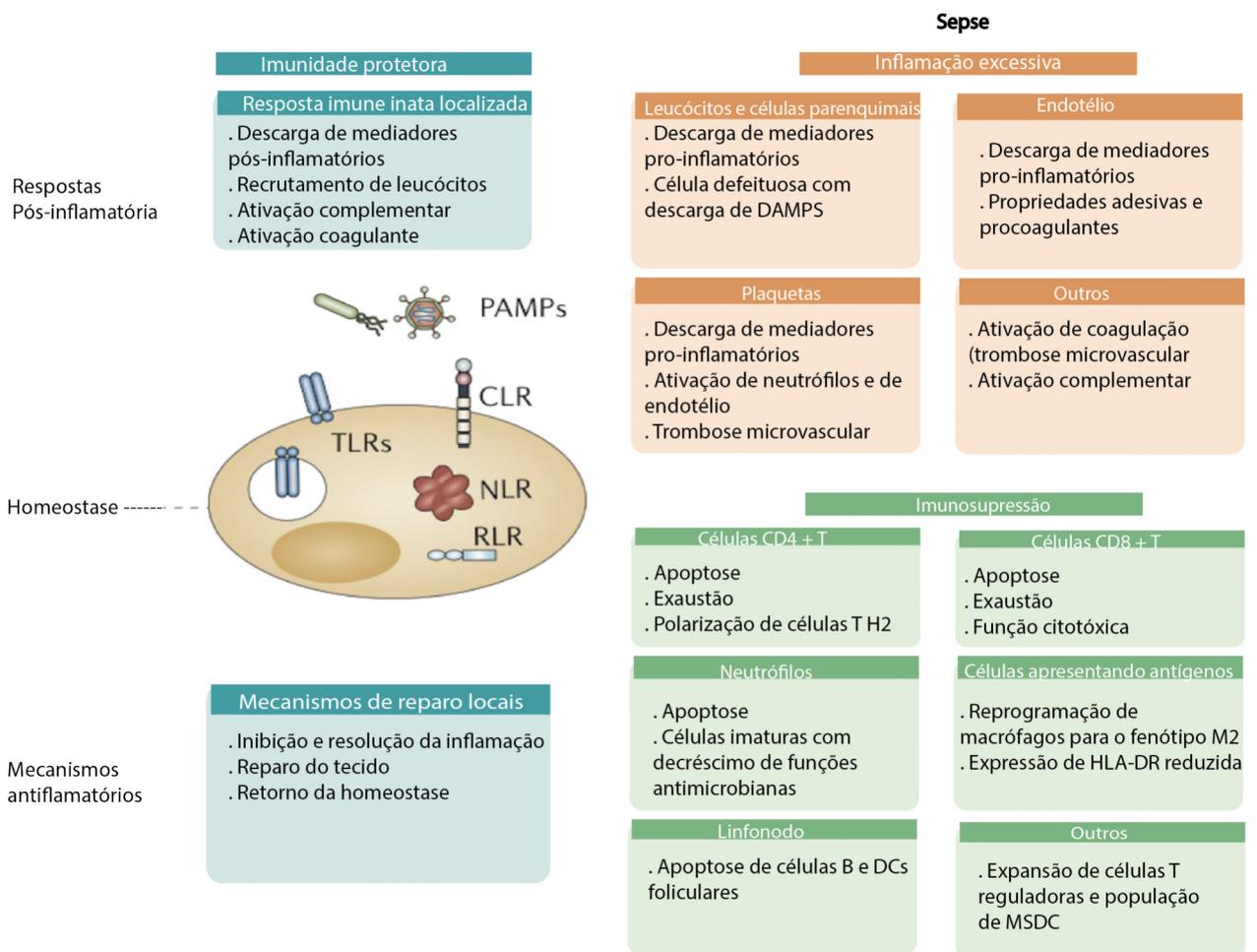


Figura 2. A resposta do hospedeiro à infecção e durante a sepse. Após a infecção, o patógeno invasor encontra o sistema imune inato (esquerda; "imunidade protetora"). Células imunológicas como os leucócitos e células do parênquima, como as células epiteliais e endoteliais estão envolvidas na resposta imune local precoce aos patógenos. Essas células percebem patógenos, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões intracelulares, incluindo receptores Toll-like (TLRs), oligomerização de ligação a nucleotídeos receptores semelhantes a domínios (NLRs; a ativação dos quais leva à formação de inflamassomas), indutíveis pelo ácido retinóico receptores semelhantes a

genes (RLRs) e receptores de lectina do tipo C (CLRs). A esquerda temos a resposta normal e a direita quando sepsis. (Adaptado de ANGUS e VAN DER POLL, 2013).

Os mediadores pró inflamatórios como, por exemplo, as citocinas fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) - 1, IL-12, e IL-18, exercem papel importante no quadro agudo de sepsis (WIERSINGA et al., 2014) e influenciam diretamente na ativação do sistema complemento, particularmente C3a e C5a, os quais têm potente ação pró-inflamatória e importante ação de recrutamento e ativação de leucócitos e plaquetas. Na verdade, existem ligações claras entre coagulação e inflamação. O fator tecidual e os fatores de coagulação, FVIIa, FXa, trombina e fibrina podem induzir a sinalização celular pró-inflamatória, em grande parte, via receptores ativados por protease. A tendência à trombose durante a sepsis é aumentada também pela atividade comprometida concomitante às três principais vias anticoagulantes: antitrombina, inibidor da via do fator tecidual e o sistema da proteína C3 acontecendo de forma disseminada e levando a tromboses microvasculares, hemorragia, agravando o dano endotelial e consumindo plaquetas.

A imunossupressão se caracteriza pela exaustão dos linfócitos e a reprogramação dos apresentadores de antígenos (WIERSINGA et al., 2014). Essa exaustão e apoptose de linfócitos T-CD4, T-CD8, linfócitos B e células dendríticas foram demonstrados em estudos pós morte, nos quais pacientes que morreram por sepsis, além de terem uma menor quantidade dessas células no baço, suas células produziram menores quantidades de interferon-gama (IFN)- γ e TNF- α comparado a pacientes que morreram por causas não infecciosas (HOTCHKISS e KARL, 2003). Estudos experimentais demonstraram que há redução da expressão de HLA-DR (MHC de classe II) em monócitos e macrófagos, diminuindo assim sua capacidade na secreção de citocinas pró-inflamatórias e um aumento de secreção IL-10 (citocina tipicamente anti-inflamatória) durante a sepsis (SCUMPIA et al., 2005). Outros fatores que contribuem para a imunossupressão são a disfunção fagocitária dos neutrófilos, o aumento de apoptose e o aparecimento de células imaturas, as quais apresentam um aumento da função oxidativa contribuindo para o dano tecidual (POLL, 2016). Outros fatores que contribuem para uma exacerbada resposta além das características do patógeno como virulência e carga parasitária são as características inerentes do hospedeiro como o ambiente inserido, fatores genéticos, idade, outras doenças associadas, medicamentos em uso (ANGUS e VAN DER POLL, 2013).

As manifestações clínicas da sepsis, tais como, febre, hipercoagulação e hipotensão periférica estão diretamente relacionadas ao perfil de citocinas inflamatórias e mediadores inflamatórios tais como: IL (interleucina) -1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, fator

de crescimento transformador β (TGF- β), fator de necrose tumoral α (TNF α) e proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1) (BURKOVSKIY et al., 2013).

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

Os metabólitos produzidos pelos fagócitos são secretados no interior do fagossomo por uma série de reações iniciadas pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase, que produz formas ativas de oxigênio incluindo os radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, fundamentais na eliminação de bactérias fagocitadas (KOBAYASHI e DELEO, 2009; MILLER e CHO, 2011).

Para a ativação da capacidade fagocítica dos macrófagos, é fundamental a participação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), que após a apresentação de antígenos pelos macrófagos, via MHC de classe II, também se ativam, proliferam e secretam citocinas, como por exemplo IFN- γ e proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1), que irão atrair mais macrófagos ativados para o sítio da infecção e assim, debelar a infecção (KOBAYASHI e DELEO, 2009; MILLER e CHO, 2011).

A Interleucina 6 (IL-6) desempenha um papel dual no quadro séptico, sendo classificada tanto como uma citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória e está correlacionada com a sepse bacteriana. A IL-6 já foi descrita como um importante marcador para gravidade do quadro (MEDURI et al., 1995). Além disso, desempenha uma importante função na diferenciação dos Linfócitos T-helper e parece ser crucial na produção de fatores teciduais. Em trabalhos experimentais de sepse, esta encontra-se elevada da mesma forma que a Interleucina 10 que exerce um papel anti-inflamatório (BURKOVSKIY et al., 2013).

2.4 Modelos experimentais de sepse

Diversos modelos experimentais de sepse são descritos na literatura e muito do conhecimento da fisiopatologia da sepse é decorrente destes modelos. Com base no agente iniciador, os modelos de sepse podem ser divididos em três categorias: administração exógena

de uma toxina (como lipopolissacarídeo (LPS), endotoxinas ou zimosan); administração exógena de um patógeno viável (como bactérias); ou alteração da barreira protetora endógena do animal (induzindo a permeabilidade do cólon, permitindo a translocação bacteriana) (BURAS et al., 2005). O melhor modelo seria aquele que mais se aproxima do curso da doença em humanos sendo esse o objetivo central de todos os modelos de sepse: reproduzir fielmente a patogênese clinicamente relevante que seja semelhante à doença observada em seres humanos.

O modelo de Ligadura e perfuração cecal (CLP) é considerado o padrão ouro para pesquisas em sepse (WICHTERMAN et al., 1980). O modelo CLP é capaz de mimetizar doenças humanas e causas comum de sepse como apendicite supurada ou diverticulite perfurada. A técnica envolve laparotomia *midline*, exteriorização do ceco, ligadura do ceco distal à válvula ileocecal e punção do ceco ligado. Esse processo cria uma perfuração intestinal com vazamento do conteúdo fecal para o peritônio, que estabelece uma infecção com flora bacteriana mista e fornece uma fonte inflamatória de tecido necrótico (AYALA et al., 2000; WICHTERMAN et al., 1980). A gravidade da doença, avaliada pela mortalidade, pode ser ajustada aumentando o tamanho da punção da agulha ou o número de punções e pode se ajustar de forma que a mortalidade evolua rapidamente ao longo de horas ou dias. A técnica CLP alcançou sua popularidade devido à sua facilidade, reprodutibilidade geral e semelhança com a progressão da doença humana recriando as fases hemodinâmicas e metabólicas (WICHTERMAN et al., 1980).

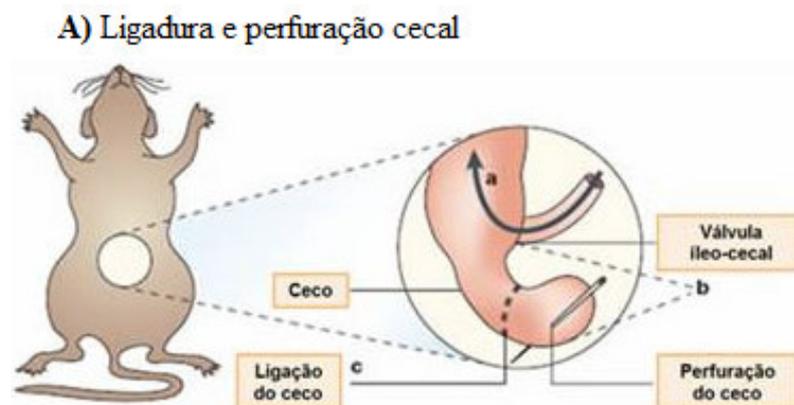


Figura 3. Modelos experimentais de sepse. (A) Ligadura e perfuração cecal, é o modelo de indução de sepse mais utilizado por maior semelhança ao quadro mais comum que acomete os humanos Adaptado de Buras et al., (2005).

2.5 Terapia para Sepsis

Apesar dos avanços significativos na compreensão da fisiopatologia da sepsis, inúmeros ensaios clínicos não conseguiram identificar novas terapias capazes de modificar o curso da doença (RANIERI et al., 2012; SPRUNG et al., 2008). É de suma importância reconhecer a sepsis como uma emergência médica, pois, na ausência de qualquer tratamento definitivo, as intervenções bem-sucedidas envolvem o controle oportuno da infecção e de suporte (PLATA-MENCHACA e FERRER, 2018). As diretrizes da *Surviving Sepsis Campaign* (SCC) de 2016 recomendam fortemente que a administração de antibióticos intravenosos de amplo espectro seja iniciada o mais rápido possível, de preferência dentro de uma hora do reconhecimento da sepsis (LEVY et al., 2018).

Vários estudos sobre sepsis e choque séptico mostraram que a administração tardia de antibióticos está associada a resultados prejudiciais (FERRER et al., 2014; PLATA-MENCHACA e FERRER, 2018). Além de seus benefícios aparentes, os antibióticos de amplo espectro podem causar danos consideráveis, incluindo eventos adversos associados a antibióticos e complicações com risco de vida devido à resistência antimicrobiana (KUMAR et al., 2009).

O conceito central é que a sepsis é uma condição grave e dependente do tempo. Tanto a administração precoce de terapia antimicrobiana apropriada quanto o controle efetivo da fonte são intervenções críticas que podem afetar diretamente a sobrevivência. Evidências têm demonstrado que os cuidados protocolizados e a ressuscitação precoce são as melhores abordagens para reduzir as mortes (BAROCHIA et al., 2010; YATACO et al., 2017). As diretrizes da CSS de 2016 estabeleceram um conjunto de recomendações incluindo a administração precoce de agentes antimicrobianos intravenosos de amplo espectro em 1 hora ou, ainda mais cedo, em pacientes com sepsis e choque séptico (PLATA-MENCHACA e FERRER, 2018; RANIERI et al., 2012). Diferentes sociedades científicas apoiam a importância do momento oportuno, pois diversos estudos têm apontado os potenciais benefícios do início precoce da antibioticoterapia adequada (Figura 4) (LEVY et al., 2018; MARTÍNEZ et al., 2020; YATACO et al., 2017).

A administração tardia de antibióticos foi associada não só ao aumento da mortalidade, mas também a outras consequências adversas como o aumento do tempo de internação do paciente (HARMANKAYA et al., 2020; ZHANG et al., 2015), lesão pulmonar aguda (ISCIMEN et al., 2008), lesão renal aguda (ALBAIDI et al., 2015) e agravamento da

disfunção orgânica devido a uma resposta inflamatória exacerbada (GARNACHO-MONTERO et al., 2006; HUANG et al., 2019).

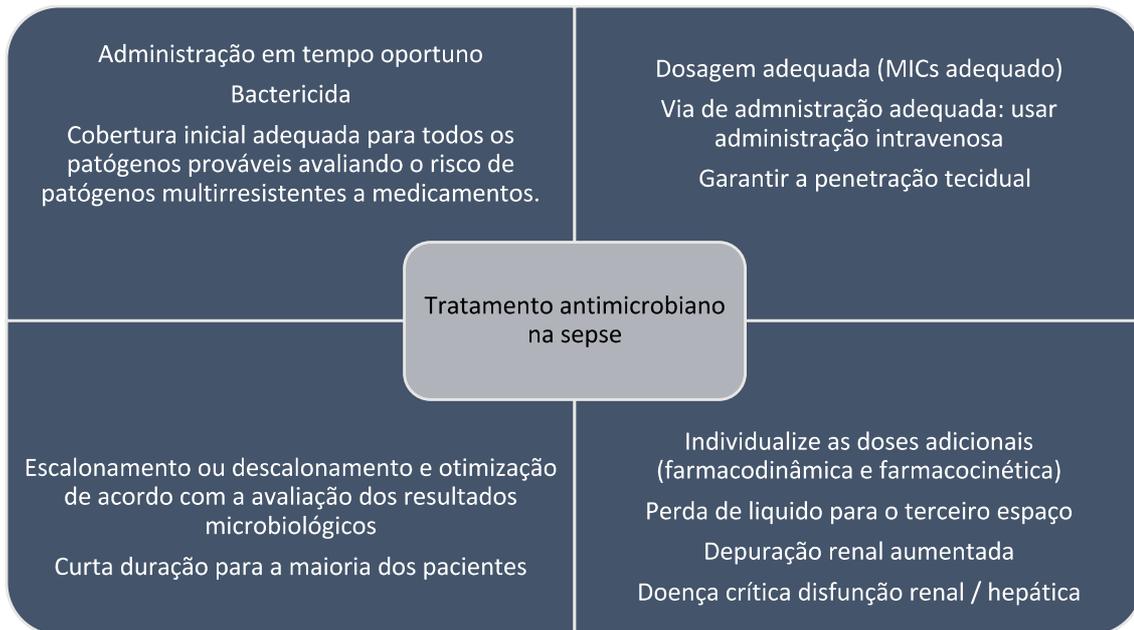


Figura 4. Quadro de boas práticas no uso de antibioticoterapia em quadros de sepse Adaptado Martínez et al., (2020)

Novas terapias como uso de doses baixas de corticoide e controle glicêmico rigoroso parece reduzir a mortalidade (RANIERI et al., 2012; SPRUNG et al., 2008) mas não existem estudos que indiquem alguma intervenção ou tratamento que seja tão eficaz quanto o uso precoce da antibioticoterapia.

2.6 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

No quadro de sepse entre os órgãos lesados, o pulmão é o primeiro e, mais frequente, órgão a falhar. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), que é o termo clínico para lesão pulmonar aguda (LPA), é um dos fatores prognósticos mais críticos para mortalidade em pacientes com sepse (LAGU et al., 2012).

A SDRA é uma síndrome mal compreendida no que diz respeito à associação entre lesão pulmonar e microcirculação (PARK et al., 2019). Difusamente, o conhecimento sobre a fisiopatologia da LPA envolve inflamação com dano alveolar difuso, aumento da permeabilidade capilar, edema intersticial e alveolar, influxo de células inflamatórias circulantes e formação de membranas hialinas (CHUNG et al., 2003).

A fim de compreender a velocidade do acometimento pulmonar e a gravidade do quadro na sepse diversos estudos são voltados para a fisiopatologia. Recentemente, um estudo relatou

evidências de trombos na vasculatura pulmonar, mas os achados foram limitados porque era um estudo *ex vivo* (WARE e MATTHAY, 2000; YUAN et al., 2017). Park et al. (2019) investigaram mais a fundo esse processo *in vivo* de influxo de neutrófilos. Usando a razão funcional capilar (RFC) como parâmetro quantitativo para avaliar a microvasculatura funcional na microcirculação pulmonar, o grupo identificou que a RFC diminui rapidamente quando a LPA é induzida pela sepse. Por meio de imagem intravital, o grupo mostrou que a geração de espaço morto foi induzida pelo aprisionamento prolongado de neutrófilos dentro dos capilares, agravando o quadro.

Na busca por marcadores de gravidade da doença, Meduri et al. (1995) avaliaram citocinas plasmáticas de 27 pacientes com SDRA durante o período de internação em Unidade de terapia intensiva. O estudo indica que o desfecho desfavorável na lesão pulmonar aguda está relacionado ao grau de resposta inflamatória no início e durante o curso da SDRA. Pacientes com níveis plasmáticos mais elevados de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 no dia 1 de SDRA tiveram aumento persistente dessas citocinas inflamatórias ao longo do tempo e morreram. Concluiu-se, ainda, que IL-1 e IL-6 isoladas foram preditores consistentes do desfecho.

2.7 Potencial biológico da própolis

A palavra própolis é uma palavra que deriva dos morfemas grego Pro – *Προ*, na frente, na entrada Poli – *Πολη* cidade (ABDULKHANI et al., 2017). É um material resinoso de composição química complexa sendo na maioria das vezes composta de 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e outras 5 % de substâncias que incluindo minerais e ácidos fenólicos (cinâmico e o cafeíco), ou seus estéres, flavonoides, terpenóides, esteroides, açúcares e aminoácidos (BANKOVA, 2005) misturada com a saliva e secreção de abelhas (SFORCIN, 2007).

Fatores que também influenciam a composição da própolis são os geográficos relacionados à região, clima e estações (BARLAK et al., 2011; ZHENG et al., 2017) que influenciam também sua ação e potencial farmacológico (KUMAZAWA et al., 2004).

A fim de utilizar um material com origem, composição e processos extrativos padronizados com uso e segurança bem descritos na literatura, o extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) da empresa ApisFlora foi utilizado por ter sua produção padronizada e por já ter sido testado em diversas instituições e modelos diferentes (MACHADO et al., 2012; BERRETTA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2021), o que permitiu maior segurança para a realização deste trabalho.

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

O efeito imunomodulador da própolis verde foi investigado por Bachiega et al., (2012) quanto à produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 por macrófagos intraperitoneais, e induzidos por LPS antes e após tratamento com própolis e com os compostos isolados ácido p-cumárico e cinâmico. A própolis e os ácidos estimularam a produção de IL-1 β , enquanto a produção de IL-6 foi significativamente inibida após a incubação com própolis (5, 50 e 100 μ g/poço) e os ácidos p-cumárico e cinâmico (50 e 100 μ g/poço). No protocolo de desafio do macrófago com lipopolissacarídeos (LPS), os ácidos inibiram eficientemente a produção de IL-6 após a incubação com o estímulo, enquanto a própolis inibiu nas duas condições, antes e após a incubação.

A ação anti-inflamatória da própolis tem sido relatada por várias pesquisas usando diferente modelos de inflamação (HU et al., 2005; PAULINO et al., 2008; TAN-NO et al., 2006; XUAN et al., 2010). A administração de 200mg/kg e em curto período de tempo inibe a produção de IFN- γ em cultura de esplenócitos murino (ORSATTI et al., 2010b), além disso o aumento no tempo de tratamento em C57Bl/6, inibe a produção de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2 E IL-10 em esplenócitos, sugerindo atividade anti-inflamatória uma vez que estas citocinas compõem as características da inflamação crônica de várias doenças (ORSATTI et al., 2010a).

Em recente estudo PIÑEROS et al., (2020) mostraram em seu estudo o efeito anti-inflamatório do Extrato de própolis verde. Em seu experimento os camundongos foram sensibilizados com hidróxido de alumínio e OVA (Sigma, St. Louis, MO, USA) por via subcutânea, quatorze dias depois da primeira sensibilização os camundongos foram injetados com 50mg de OVA intraperitoneal, sete dias depois da segunda sensibilização os camundongos foram desafiados, depois de 3 dias a resposta imune e inflamatória foi avaliada. Os camundongos receberam tratamento com própolis 150mg por 22 dias. O estudo demonstrou o efeito imunomodulador da própolis aumentando a quantidade de MDSC e células TCD4, diminuindo também o dano tecidual e a produção de muco e processo inflamatório.

Silveira et al. (2019) investigaram os efeitos da própolis verde em pacientes com doença crônica renal, considerando os impactos na função renal e proteinúria. Esta pesquisa incluiu pacientes entre 18 e 90 anos de idade que foram diagnosticados com doença renal crônica

causada por diabetes ou outra etiologia com uma eGFR de 25-70 ML/min por 1.73 m² e proteinúria junto com micro ou macro-albuminúria definida como uma proporção urinária de albumina a creatina (UACR) > 30mg/g creatinina urinária (uCr) e > 300 mg/g uC, respectivamente, o estudo demonstrou que o extrato de própolis verde brasileiro foi seguro, bem tolerado e reduziu significativamente a proteinúria em pacientes com DRC de etiologia diabética e não-diabética.

Silveira et al., (2021) em modelo, semelhante ao utilizado nesse trabalho, de sepse induzida por CLP em ratos mostrou redução importante de fatores que impactam diretamente no prognóstico da sepse como: redução da lesão renal aguda e da lesão pulmonar nos animais que receberam tratamento com extrato de própolis verde na dose de 500mg/kg 6 horas após procedimento de indução. Essa melhora teve importante relação com a redução de células e citocinas inflamatórias nos rins e pulmão dos animais com sepse que receberam o tratamento com própolis.

No contexto em que vivemos da pandemia pelo vírus SARS-COV2 (BERRETTA et al., 2020) verificou-se, por meio da literatura, o potencial da própolis no contexto da patologia causada pelo vírus, ressaltando a literatura os efeitos antiinflamatórios e imunorreguladores comprovados, incluindo a inibição da PAK-1. Além disso, verificou-se a ligação à ACE2, um dos principais alvos do vírus SARS-CoV-2 para a invasão da célula hospedeira que é inibida pela própolis.

Alguns compostos de própolis verde, como o éster feniletil do ácido cafeico (CAPE) têm mostrado efeito na supressão da síntese de prostaglandinas e leucotrienos por macrófagos (BORRELLI et al., 2002). Além disso o CAPE, quercetina, hesperidina e alguns outros flavonóides da própolis podem inibir a produção de citocinas de células T do tipo Th1 e Th2, ao mesmo tempo em que aumentam o TGF-beta 1, uma importante citocina anti-inflamatória (ANSORGE et al., 2003). A artepelina C induziu efeito anti-inflamatório e analgésico em modelo experimental de inflamação por carragenina após tratamento oral ou intraperitoneal (CONTI et al., 2015; PAULINO et al., 2008). A atividade anti-inflamatória também foi observada por Machado et al., (2012) na inibição de citocinas proinflamatórias e aumento de citocinas inflamatórias em modelo de infecção com granuloma e LPS.

A respeito da atividade antimicrobiana da própolis, muitos trabalhos têm descrito a atividade antibacteriana em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* (FARNESI et al., 2009). *In vitro*, a própolis tem ação direta em microrganismos e *in vivo* podendo estimular a resposta

imunológica, ativando mecanismos envolvidos na morte de microrganismos (BÚFALO et al., 2009; SFORCIN e BANKOVA, 2011; DE CASTRO et al., 2013; CAPOCI et al., 2015).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da profilaxia com extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) em camundongos com sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da profilaxia com Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF®) sobre os seguintes parâmetros de animais submetidos à sepse induzida por CLP:
 - Sobrevida
 - Unidades formadoras de Colônia no sangue, peritônio e pulmão
 - Contagem celular do sangue periférico, medula e peritônio
 - Fatores de coagulação
- Avaliar o efeito da profilaxia com o Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF®) na inflamação pulmonar.

4. Material e métodos

4.1 Extrato de Própolis Padronizado (EPP-AF®)

O extrato padronizado de própolis (EPP-AF) foi produzido a partir de uma mistura composta por material prima de própolis obtida das regiões Sul e Sudeste do Brasil de acordo com a padronização anterior (Patente PI 0405483-0, publicada em Revista de Propriedade Industrial n. 1778 de 01/02/2005), a composição da mistura é constituída majoritariamente por própolis verde. O extrato foi produzido industrialmente e cedido pela Apis Flora Ltda. (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Resumidamente, a própolis foi mantida em -20°C durante 12 h, triturada num pó fino num misturador. Em seguida, foi extraído com solução hidroalcoólica (7: 3), com maceração dinâmica, durante 72 h à temperatura ambiente, seguido de percolação e um processo de filtração utilizando, no primeiro passo, a biomassa de própolis e, filtro de linha. O extrato de própolis obtido apresenta 11% p/v de matéria seca e composição química padronizada qualitativa e quantitativamente por RP-HPLC.

O extrato mole de própolis, que foi obtido após a evaporação de todo o solvente presente no extrato padronizado, foi dissolvido em óleo de rícino etoxilado – 40 OE (Kollidon - Basf®) sob aquecimento (37°C) por 2h, na proporção de 1:1. As soluções para o tratamento dos animais foram obtidas pela solubilização da mistura anterior em solução PBS (1%). A dose ou concentrações utilizadas foi com base nos resultados obtidos por Horii et al. (2013).

4.2 Animais

No estudo foram utilizados 45 camundongos da linhagem *Swiss*, fêmeas com idade entre 8 a 14 semanas, oriundos do Biotério Central da UFMA. Eles foram mantidos com livre acesso à ração e à água durante todo o estudo, e submetidos a ciclos de luz/escuridão de 12 horas. Cada camundongo fora submetido aos estudos na mesma hora do dia para minimizar influências circadianas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão- UFMA (Número de protocolo 23115.014190/2018-98).

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

Os animais foram anestesiados com injeção de solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular. A infecção polimicrobiana foi induzida pela ligadura e perfuração cecal (CLP), abaixo da válvula ileocecal. O ceco foi

perfurado dez vezes com agulha de calibre 18 G, e levado de volta para a cavidade peritoneal, induzindo a sepse letal (MACIEL et al., 2008). Após este procedimento, o peritônio e o abdômen foram suturados com ponto simples separado. Todos os animais receberam 50mL/kg de peso do animal de soro fisiológico estéril após o procedimento cirúrgico por via subcutânea, como fluido de ressuscitação, com a finalidade de prevenir a hipotensão pós-operatória (WICHTERMAN et al., 1980; BENJAMIM et al., 2002).

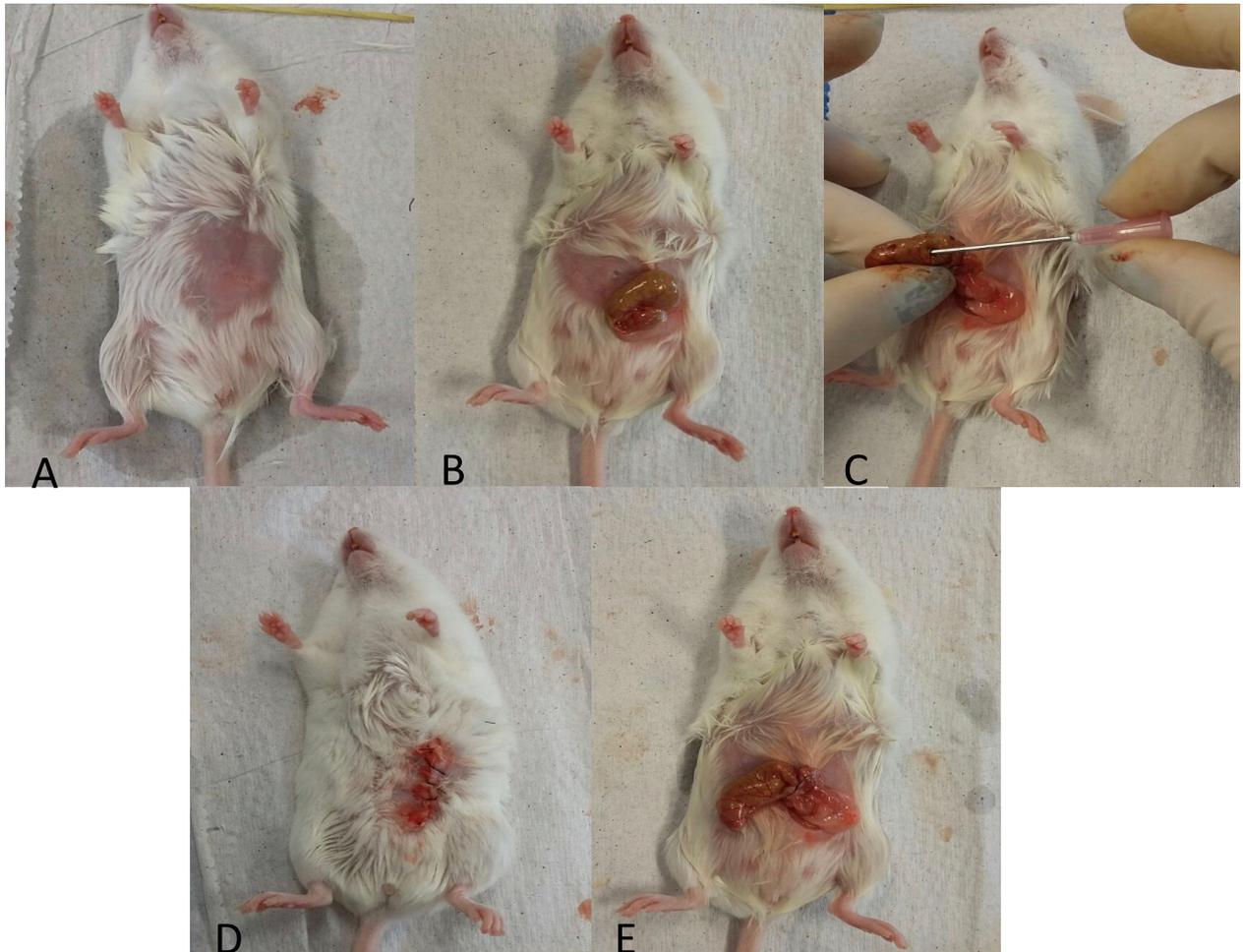


Figura 5 Indução de sepse pelo modelo CLP **A)** Tricotomia realizada anterior a cirurgia com animais anestesiados. **B)** Exposição do ceco para ligadura e perfuração. **C)** Ligadura da válvula ileocecal. **D)** Perfuração do ceco com agulha de calibre 18G. **E)** Abdômen suturado em ponto simples separado.

4.4. Delineamento experimental

Inicialmente, os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=5 animais/grupo): SHAM (os animais passaram pelo processo cirúrgico, sem perfuração do ceco, receberam soro fisiológico estéril 0,9% de reanimação), CLP (receberam soro fisiológico estéril 0,9% e passaram por CLP), CLP+ATB (receberam a profilaxia com antibiótico de amplo espectro

(Imipenem) na dose de 5mg/kg e passaram por CLP), EPP-AF®10 (receberam profilaxia com dose única do EPP-AF®, na dose de 10 mg/kg e passaram por CLP), EPP-AF®100 (receberam profilaxia com dose única do EPP-AF®, na dose de 100 mg/kg e passaram por CLP). Todas as profilaxias foram realizadas por via subcutânea, 6 horas antes do procedimento cirúrgico visto que esse foi o tempo descrito em outros trabalhos que evita o edema pulmonar e mortalidade pós cirúrgica (WICHTERMAN et al., 1980; MACIEL et al., 2008).

4.5. Avaliação da sobrevida dos animais

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

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

4.6. Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC)

Para a quantificação de bactérias no sangue, lavado peritoneal e pulmão foram coletados 10µL do exsudato e feita diluição em 1:10 e 1:100. Em seguida, estas diluições foram semeadas em placas de Petri em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI). As placas foram mantidas em estufa a 37°C, por 24h, para crescimento de colônias bacterianas (OLIVEIRA et al., 2019).

4.7 Obtenção e contagem das células da medula óssea e células peritoneais

As células da medula óssea foram obtidas a partir da perfusão do fêmur seguida de lavagem com 1 mL de PBS com auxílio de seringa. As células peritoneais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 2 mL de solução tamponada de fosfato (PBS) estéril gelada. Para a determinação do número total, as células da medula óssea e células peritoneais foram coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1, e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz comum.

Para a contagem diferencial das células peritoneais foi realizado Cytospin. As células foram coradas com auxílio do kit InstantProv (Newprov, Pinhais, Brazil). A contagem das células foi feita com auxílio de microscópio óptico de luz comum (OLIVEIRA et al., 2019).

4.8 Histopatológico

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

4.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPadPrism 5.0. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Após constatada normalidade pelo teste D'Agostino-Pearson, as variáveis numéricas foram submetidas à análise da variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ou a two-way ANOVA. Para os dados de sobrevivência, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank para análise estatística. Os dados da avaliação histopatológica foram analisados pelo teste *t* não paramétrico. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$) (SOKAL; ROHLF, 1996).

5. Resultados

5.1 O EPP-AF® aumenta a sobrevivência de camundongos com sepse letal induzida por CLP.

O uso profilático de EPP-AF® protege os animais da sepse letal induzida por CLP (Figura 6). Os grupos EPP10 e EPP100 apresentaram um aumento na sobrevivência quando comparados ao grupo CLP, sendo o aumento na expectativa de vida de 16,7% e 25%, respectivamente, quando comparados ao grupo CLP (Tabela 4).

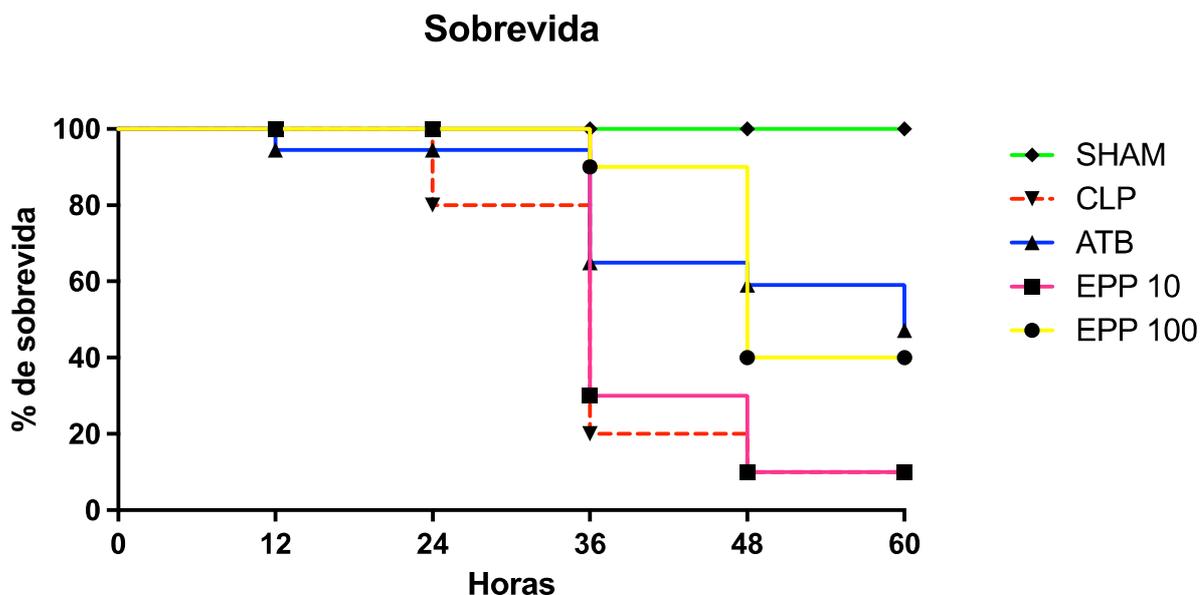


Figura 6. Sobrevida de animais com sepse letal induzida por CLP. Camundongos Swiss foram distribuídos em 5 grupos: SHAM (os animais passaram pelo processo cirúrgico, sem perfuração do ceco, receberam soro fisiológico estéril 0,9% de reanimação), CLP (receberam soro fisiológico estéril 0,9% e passaram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

Tabela 4. Expectativa de vida de animais com sepse letal induzida por CLP e que receberam profilaxia com EPP-AF® (EPP10 e EPP100) 6 horas antes da CLP.

TRATAMENTO	MST ^a (Dias)	ILS ^b %
Controle	33,6	—*
ATB	51,0*	51
EPP 10	39,0	16
EPP 100	42,0*	25

^aMST *mediana da sobrevida total*; ^b ILS: *aumento da sobrevida*

*p<0,05 em relação ao grupo Controle

5.2 O EPP-AF® não altera o número de Unidades formadoras de colônia em camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Em razão do aumento observado na sobrevida dos animais que receberam a profilaxia com EPP-AF®, selecionamos a maior dose que apresentou maior sobrevida (Tabela 4). Os resultados demonstraram crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) não só no

local da indução da infecção, mas a disseminação sanguínea e pulmonar. Entretanto, não houve diferença quando se compara o grupo que recebeu profilaxia com EPP-AF® com o grupo controle no peritônio (Figura 7A), sangue (Figura 7B) e pulmão (Figura 7C).

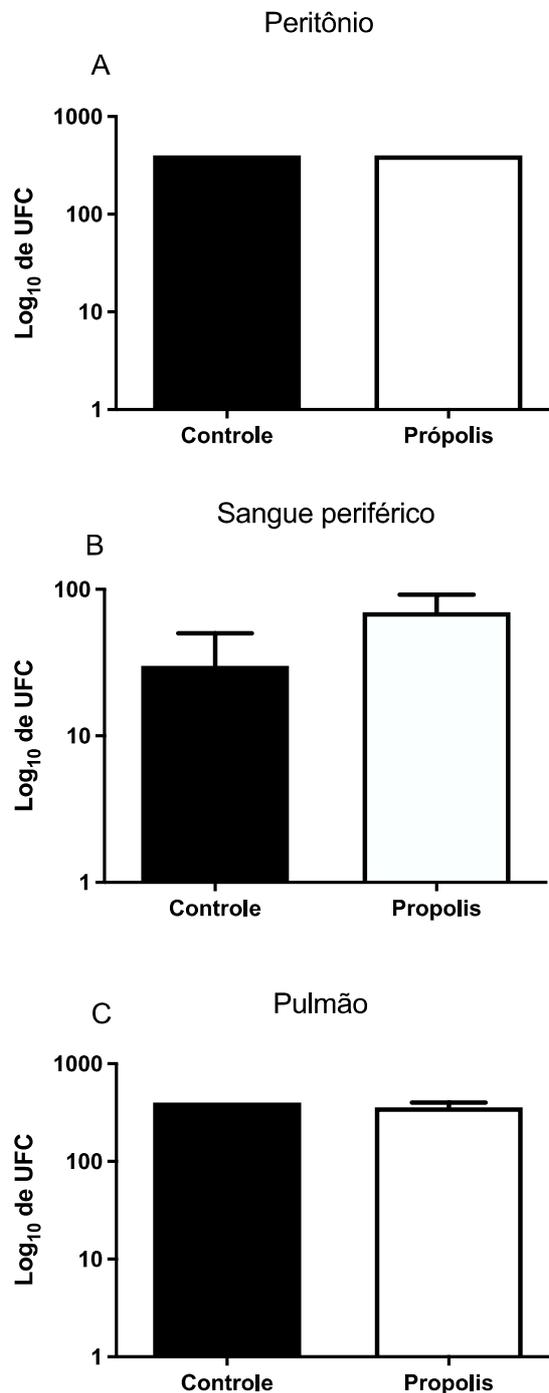


Figura 7. Efeito do tratamento profilático com Própolis (EPP-AF®) sobre as Unidades formadoras de Colônia (CFU) em animais com sepse induzida por CLP. Os animais receberam a profilaxia com EPP100, 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. (A) peritônio; (B) sangue; (C) pulmão. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo própolis. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

5.3 O EPP-AF® não altera a celularidade da medula óssea e do sangue em camundongos com sepse letal induzida por CLP.

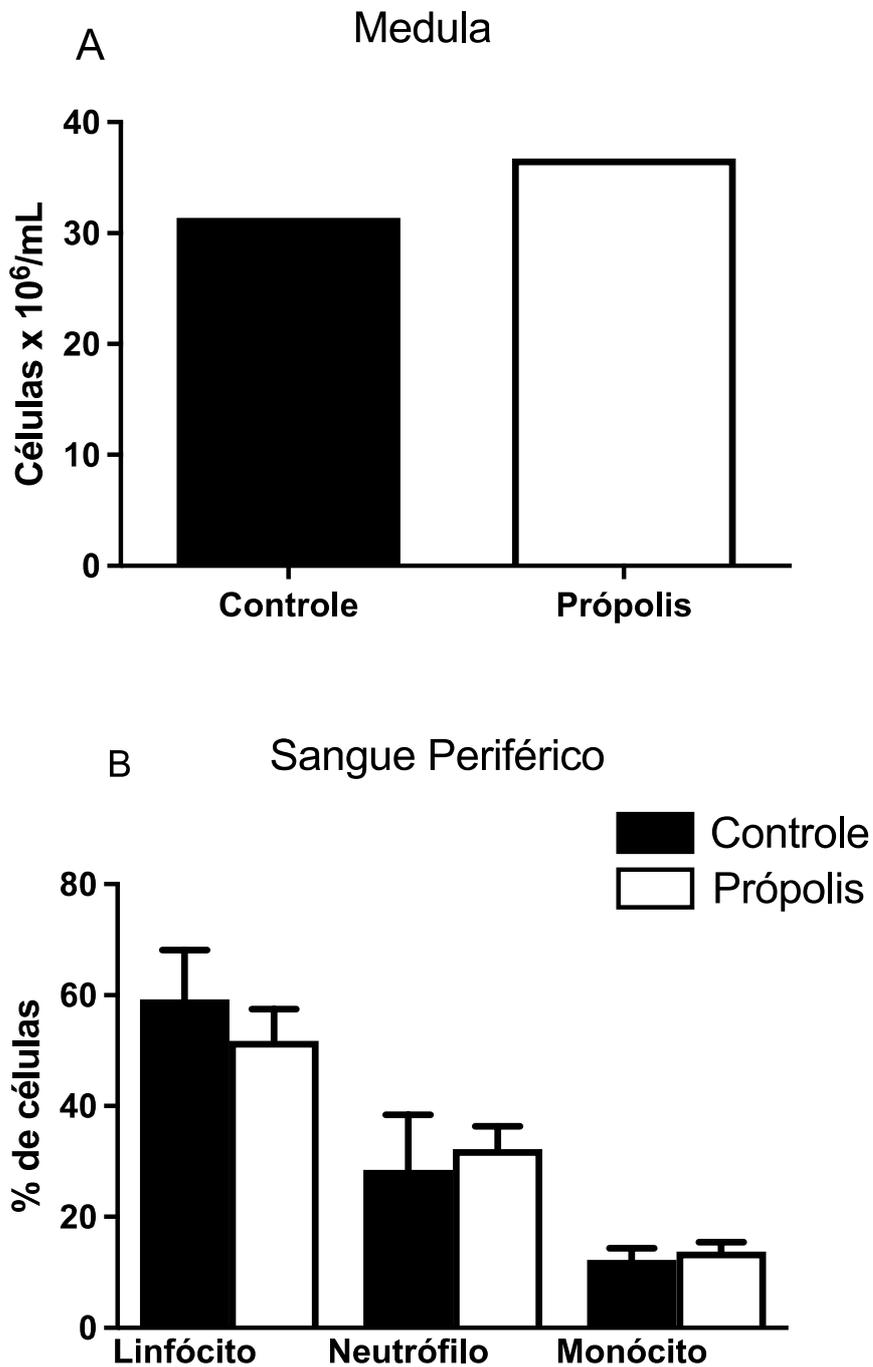


Figura 8. Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do sangue periférico. Os animais receberam a profilaxia com EPP100, por via subcutânea 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. A contagem total dessas células foi feita 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão.

5.4 O EPP-AF® altera o número de células peritoneais em camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Sabendo que o recrutamento de células inflamatórias ao foco da infecção é importante para o controle da disseminação bacteriana, foi avaliado o infiltrado inflamatório na cavidade peritoneal. O EPP-AF® reduziu a contagem total de células no sítio da infecção (Figura 9), porém, quando foi analisada a contagem diferencial, observou-se que houve uma redução de macrófagos (8%) e linfócitos (15%) e um significativo aumento de neutrófilos (40%) na cavidade peritoneal.

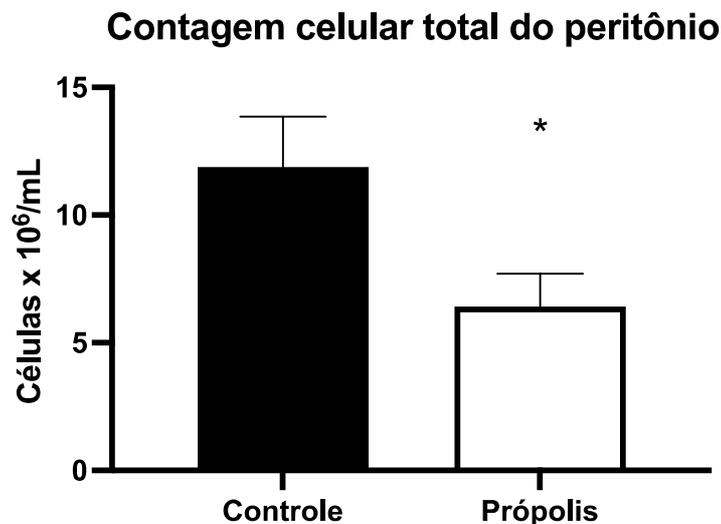


Figura 9. Efeito do tratamento profilático com Própolis na contagem celular total do lavado peritoneal. Os animais receberam a profilaxia com EPPAF por via subcutânea 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. A contagem total dessas células foi feita 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ quando comparado ao Controle.

5.5. O EPP-AF® não altera os parâmetros de coagulação de camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Uma das alterações importantes que acontecem na sepse é a alteração da coagulação. Então foram avaliados os efeitos do EPP-AF® no número de plaquetas, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina. Entretanto, não houve diferença entre os grupos quanto ao número de plaquetas (Figura 10A), bem como em relação ao TTPA (Figura 10B), TAP (Figura 10C) e Relação normatizada internacional (RNI) (Figura 10D).

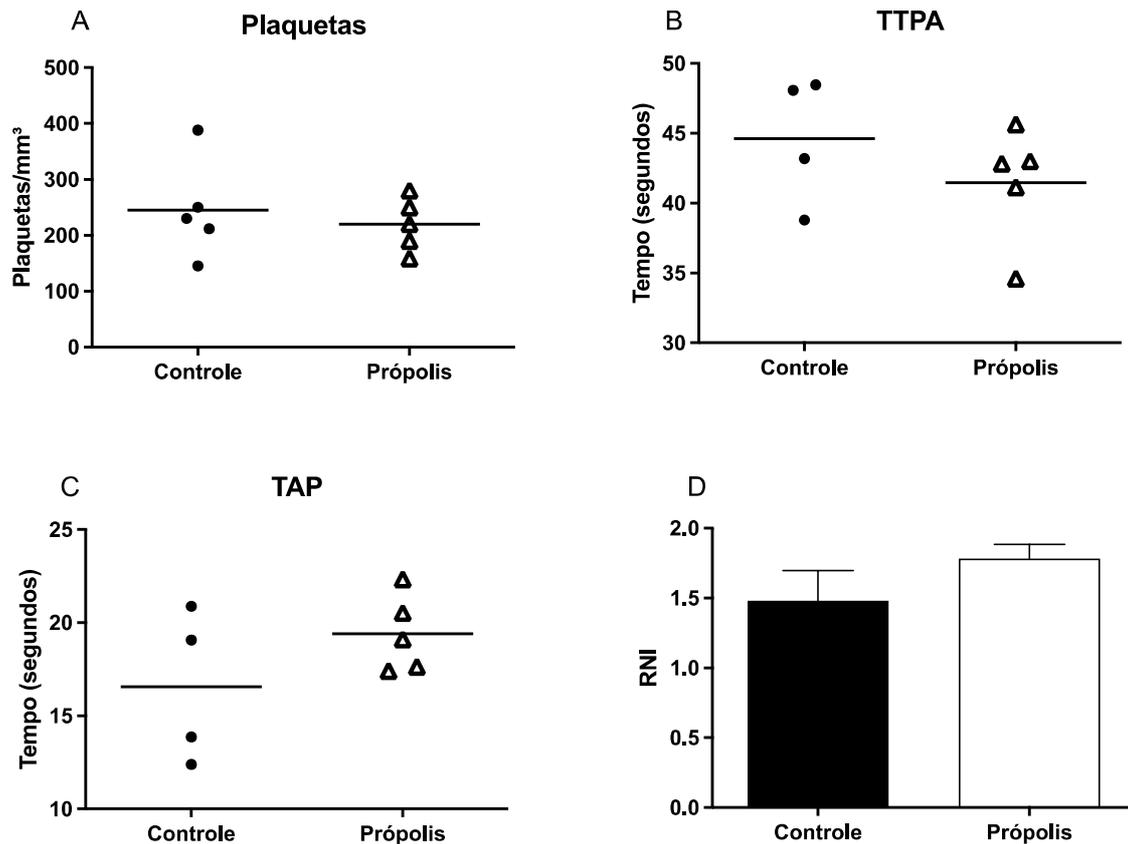


Figura 10. Efeito do tratamento profilático com Própolis nas plaquetas, TAP, TTPA, RNI. Os animais receberam o tratamento profilático com EPP-AF® 6 horas antes da indução da Sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP. (A) Plaquetas; (B) TTPA; (C) TAP (D) RNI. Os resultados apresentam as médias de 4 animais do grupo controle e 5 animais do grupo tratado. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão.

5.6. O EPP-AF® altera a inflamação no foco primário da infecção e inibe a inflamação no pulmão de camundongos com sepse letal induzida por CLP.

Sabendo que a própolis reduziu o infiltrado inflamatório e alterou o perfil celular no foco da infecção, foi realizado a análise histopatológico do ceco, órgão que recebeu a perfuração. Entretanto, não foi observada diferença no ceco entre os animais que receberam tratamento com EPP-AF® e o grupo controle e ambos os grupos apresentaram grande degradação tecidual (Tabela 7 e Figuras 11 A-D).

Apesar de não ter sido encontrada diferença no ceco, a análise do pulmão, órgão chave para o prognóstico da sepse, foi observado que o EPP-AF® induziu uma redução na hemorragia, necrose, infiltrado inflamatório e edema no pulmão dos animais com sepse (Tabela 7 e Figuras 11 E-F).

Tabela 5. Efeito do tratamento profilático com própolis sobre a inflamação no ceco e pulmão de animais com sepse induzida por CLP. Resultado da análise do histopatológico do material coletado 12 horas após a indução da sepse. O grupo controle recebeu tratamento com PBS e o grupo tratado recebeu tratamento com EPP-AF®.

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

*p<0,05 em relação ao grupo controle

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

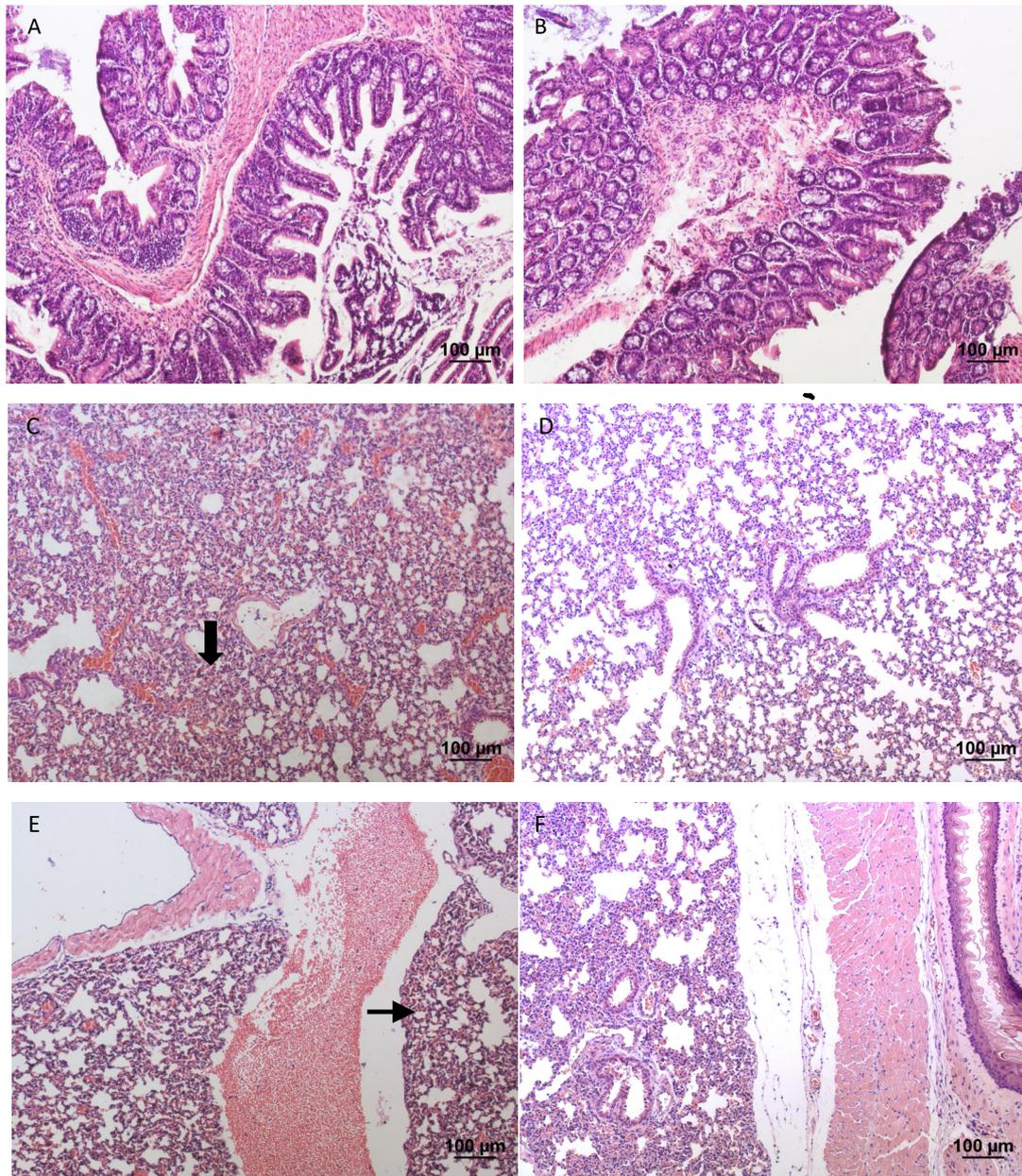


Figura 11. Efeito do tratamento profilático com EPP-AF® em animais com sepse induzida por CLP. Em **A**, fotomicrografia do ceco do grupo CLP. Em **B**, fotomicrografia do ceco do grupo EPP-AF®. Em **C-E**, fotomicrografia do pulmão do grupo CLP. Em **D-F**, fotomicrografia do pulmão do grupo EPP-AF®. A seta na foto **C** indica área de necrose e hemorragia e na foto **E** indica hemorragia. Os animais receberam a profilaxia com EPP-AF®100, por via subcutânea, 6 horas antes da indução da sepse por CLP. As avaliações ocorreram 12 horas após a indução da sepse pelo modelo da CLP, os órgãos foram retirados, colocados em formol e enviados para o histopatológico. A análise das lâminas foi feita de forma cega.

6. Discussão

Neste trabalho foi demonstrado que a profilaxia com o extrato padronizado de própolis aumenta a expectativa de vida de camundongos com sepse, pela capacidade de reduzir o processo inflamatório preservando o parênquima pulmonar, mudando assim, a história natural da doença.

O aumento na sobrevivência em animais que receberam a profilaxia com própolis pode estar relacionado às propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras que o extrato de própolis exerce em quadros como a sepse (SOARES, 2014; SILVEIRA et al., 2021). A gravidade e letalidade da sepse está diretamente relacionada a exacerbação da resposta imunológica ao agente infeccioso (SINGER et al., 2016). O pulmão é o órgão que é primeiramente afetado e em maior intensidade, que sinaliza o pior prognóstico em pacientes com sepse, por causa da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (LAGU et al., 2012). A lesão pulmonar aguda é caracterizada por aumento de citocinas pró-inflamatórias (MEDURI et al., 1995) e aumento de trombos na microvasculatura pulmonar (WARE e MATTHAY, 2000) que está diretamente relacionado à diminuição da razão funcional capilar pelo aprisionamento de neutrófilos dentro dos capilares (PARK et al., 2019). Terapias capazes de aumentar a expectativa de vida, em quadros de sepse, são extremamente importantes, visto que a fisiopatologia da doença passa por diversas fases imunológicas até sua resolução (HUANG et al., 2019).

Esse processo inflamatório sistêmico impacta negativamente no prognóstico da sepse, sendo suas principais complicações a Insuficiência Renal Aguda (IRA) e a lesão pulmonar aguda (LPA). A LPA se caracteriza como uma síndrome clínica associada à disfunção respiratória, sendo a complicação mais comum da sepse e com mortalidade que varia de aproximadamente 50% (HERRIDGE et al., 2003) a 26% (ERICKSON et al., 2009). A fisiopatologia da LPA envolve inflamação com dano alveolar difuso, aumento da permeabilidade capilar, edema intersticial e alveolar, influxo de células e citocinas pró-inflamatórias (MEDURI et al., 1995), formação de membranas hialinas (CHUNG et al., 2003) e aumento de trombos na microvasculatura pulmonar (WARE e MATTHAY, 2000).

Neste trabalho, foi demonstrado que o aumento da sobrevivência dos animais com sepse induzido pelo tratamento com EPPAF, muito provavelmente, está relacionado com a preservação pulmonar. Estes dados corroboram com diversos trabalhos usando diferentes tipos de própolis e seus compostos. Nosso grupo, por exemplo, demonstrou que o tratamento com própolis de *Scaptotrigona postica*, por via oral, por 14 dias, nas doses de 50 e 200mg/kg, induziu diminuição do infiltrado de neutrófilos no parênquima pulmonar e da concentração de

IFN- γ circulante e aumento da preservação do parênquima pulmonar quando comparado ao grupo controle, em modelo experimental de asma induzido por ovalbumina (FARIAS et al., 2014). Na mesma via, nosso grupo demonstrou que o tratamento com EPPAF, por via oral, na dose de 5mg/kg, induziu diminuição de IL-6, TNF- α e aumento de IL-10 no lavado broncoalveolar em modelo de indução de Inflamação pulmonar aguda por instilação nasal de LPS (MACHADO et al., 2012).

Assim como o efeito benéfico da própolis em inflamação pulmonar, quer seja própolis de *Apis mellifera* quer seja de *Scaptotrigona postica*, também foi demonstrado por outros autores usando CAPE. Korish e Arafa (2011), usando modelo de indução de sepse por LPS, demonstraram que o tratamento com derivados do extrato de própolis (CAPE) induzia um quadro mais brando de sepse com uma moderação do processo inflamatório. Neste trabalho foi demonstrado que o grupo sem tratamento teve aumento de citocinas pró inflamatórias como IL-1 e IL-6 e o grupo que recebeu o tratamento com o derivado da própolis (CAPE) teve aumento de IL-10, citocina que exerce função contrarreguladora de IL-6. Todos estes dados, em conjunto, mostram que a própolis usada neste trabalho, bem como subprodutos e até mesmo própolis de abelhas nativas, podem ter um papel relevante no controle de inflamação pulmonar.

A redução do infiltrado de células inflamatórias no pulmão dos animais que receberam EPPAF também foi observado na cavidade peritoneal. No modelo utilizado, o peritônio é o local da primo infecção, estando exposto a lesão endotelial induzida e o contato direto com o conteúdo da alça intestinal lesionada sendo assim o primeiro local a produzir resposta inflamatória. Este efeito inibidor da peritonite corrobora com Paulino et al. (2008) que mostraram, em modelo peritonite induzida por carragenina, que o composto da própolis verde Artepelina C foi capaz de inibir o processo inflamatório inibindo o infiltrado de células na cavidade peritoneal e reduzindo a concentração de prostaglandinas E2 no lavado peritoneal. Adicionalmente, é interessante notar que apesar do EPPAF ter diminuído o infiltrado total do peritônio, ele modulou a resposta, uma vez que reduziu o infiltrado de macrófagos e linfócitos e aumentou o infiltrado de neutrófilos, células essenciais para o controle agudo da infecção bacteriana. Esta imunomodulação inflamatória na sepse já havia sido demonstrada por nosso grupo, no mesmo modelo, utilizando tratamento profilático com extrato de *Syzygium jambolanum* (MACIEL et al., 2008), resultando em bom prognóstico da doença e aumento da expectativa de vida dos animais. Esses dados, em conjunto, reforçam a importância do tratamento profilático com produtos que tenham papel imunomodulador.

Um dado importante é que a redução do recrutamento de células para o foco da infecção e para o pulmão, não está relacionado com aplasia medular, uma vez que o número de células da medula óssea não foi alterado, bem como o percentual de células sanguíneas. Isto é importante, considerando que muitos agentes anti-inflamatórios usados na clínica induzem comprometimento medular (FARIAS et al., 2014).

O modelo CLP de sepse é o mais utilizado dos modelos por mimetizar a sepse em humanos. O modelo causa uma infecção polimicrobiana levando a uma inflamação sistêmica com lesão de múltiplos órgãos (WICHTERMAN et al., 1980; BURAS et al., 2005) além de ser um modelo amplamente utilizado por nosso grupo (BRAGA FILHO et al., 2018; MACIEL et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2019; RIOS et al., 2017). Para avaliarmos esse acometimento sistêmico infeccioso foram avaliadas as Unidades Formadoras de Colônia do sangue, pulmão e peritônio, mas não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo controle mostrando que o tratamento profilático não interferiu nas UFC de forma sistêmica. Este resultado, sugere fortemente que o efeito observado neste trabalho em relação ao aumento da sobrevivência dos animais está relacionado ao bem conhecido efeito antiinflamatório da própolis (ARAÚJO et al., 2011) e não ao seu efeito antimicrobiano já demonstrado por diversos autores *in vitro* (KUJUMGIEV et al., 1999; LALLO et al., 2002; PINTO et al., 2001; SFORCIN et al., 2001; STEPANOVIĆ et al., 2003; BANKOVA, 2005; BOSIO et al., 2000; FERNANDES JR et al., 1995; FERNANDES JÚNIOR et al., 2006).

Como já mencionado, na sepse ocorre o aumento de trombos na microvasculatura pulmonar (WARE e MATTHAY, 2000) e também ocorre coagulação intravascular disseminada (KINASEWITZ et al., 2005). Os estudos da microcirculação evidenciam a importância da ativação endotelial, com liberação de citocinas (IL-6, IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), formação de espécies reativas do oxigênio e liberação de óxido nítrico, culminando com ativação do sistema de coagulação, com formação de microtrombos, alterações da perfusão regional, hipóxia tecidual, disfunção celular e evolução para disfunção de múltiplos órgãos (NIMAH e BRILLI, 2003). Diversos estudos que avaliaram as alterações da coagulação na sepse e evidenciaram que a coagulopatia atua como um fator independente de prognóstico. As alterações laboratoriais vistas na sepse incluem plaquetopenia, alargamento do TAP e do Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), aumento do D-dímero, queda dos níveis de proteína-C e atividade de trombina (TAP) (DHAINAUT et al., 2005; KINASEWITZ et al., 2005). Entretanto, neste estudo, a profilaxia com EPPAF não modificou o número de plaquetas e parâmetros de coagulação entre os grupos.

Tendo em vista a fisiopatologia da sepse e os efeitos sistêmicos da própolis verde foram avaliados o sítio primário da infecção (ceco) e o pulmão como órgão secundário, pela gravidade do seu acometimento e que sinaliza o pior prognóstico em pacientes com sepse (LAGU et al., 2012), quanto aos parâmetros de hemorragia, infiltrado, necrose e edema. No ceco, local do sítio infeccioso não foram observadas diferenças entre os grupos. Entretanto, foi observada, nos pulmões, uma redução da hemorragia, necrose tecidual, infiltrado inflamatório e edema quando comparado o grupo tratado com o grupo controle. Estes dados sugerem que a sobrevivência aumentada dos animais, está diretamente relacionada com a melhoria do estado geral do pulmão.

O comprometimento pulmonar na sepse se deve a LPA. Rojas et al., (2005) descreveram a evolução da LPA em modelo experimental com murino no qual foi realizada a administração de endotoxina bacteriana gram-negativa lipopolissacarídeo (LPS) via pulmonar, modelo animal que se aproxima à sepse de foco pulmonar em outras espécies, e avaliaram o histopatológico em diferentes tempos. Seis horas após administração de endotoxina foi observado que havia congestão e infiltração de células inflamatórias que pareciam ser predominantemente neutrófilos. Às 24 horas, havia mais inflamação e espessamento septal e em 48 horas, as alterações estavam resolvidas, embora um número maior de neutrófilos ainda estivesse presente. A história da evolução da LPA induzida difere quanto ao tempo de exposição ao agente agressor, que em nosso trabalho acontece de forma intermitente, e ao momento de avaliação, que em nosso trabalho acontece as 12 horas, mas a progressão da doença nos mostra quão aguda é a evolução e a necessidade de uma intervenção precoce que mude a história da doença nos casos de estímulo intermitente.

Machado et al., (2012), em modelo adaptado, em nosso laboratório, mostraram que os animais que receberam o tratamento com extrato de própolis verde, por via oral, em modelo de infecção granulomatosa tiveram redução de edema do granuloma e um efeito sistêmico em sítio pulmonar. Neste sítio, os animais que receberam o tratamento com a própolis verde tiveram aumento significativo de macrófagos e neutrófilos no lavado broncoalveolar (BAL) quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento. A partir desse resultado Machado et al., (2012) induziram a inflamação pulmonar com LPS e os animais que receberam tratamento com o extrato de própolis verde tiveram diminuição de células totais no BAL além da diminuição da produção de IL-6, citocina essa relacionada com a inflamação e que exerce função na fisiopatologia da formação de trombos (NIMAH e BRILLI, 2003) e elevação de IL-10 citocina contrarreguladora da IL-6. Esses resultados sugerem que o extrato de própolis quando usado

em forma de tratamento oral foi capaz de modular a resposta inflamatória por meio do recrutamento celular no local da infecção, reduzindo o número de neutrófilos os quais poderiam ser danosos para o tecido pulmonar (HENDERSON, 2005). Esses achados são indicativos do mecanismo envolvido na preservação do parênquima pulmonar nos animais que receberam a profilaxia com EPPAF na sepse induzida por CLP.

Em recente estudo, utilizando o mesmo modelo de indução de sepse em ratos Silveira et al., (2021) mostraram redução importante de fatores e que pioram o prognóstico na sepse como redução da lesão renal aguda e da lesão pulmonar em animais que receberam tratamento com extrato de própolis verde na dose de 500mg/kg, 6 horas após procedimento de indução. Essa melhora teve importante relação com a redução de células e citocinas inflamatórias nos rins e pulmão dos animais com sepse. O mecanismo proposto para o aumento de sobrevida dos animais e menor lesão dos rins e pulmão nos animais que receberam o tratamento foi a diminuição da expressão de TLR4 nesses órgãos. A ativação de TLR4 está ligada a dano celular e células mortas (MOLTENI et al., 2016). Li et al. (2017) demonstraram os efeitos anti-inflamatórios do CAPE nos fibroblastos gengivais humanos induzidos por LPS. Seus resultados indicaram que o CAPE inibe a produção de IL-6, IL-8, óxido nítrico sintase induzível e COX-2 induzida por LPS, de forma dose-dependente. Foi mostrado também que o CAPE suprime a ativação induzida por LPS de TLR4 / fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e NF- κ B.

Esses achados nos ajudam a compreender o aumento na sobrevida no modelo utilizado aqui com camundongos, uma vez que a preservação do tecido pulmonar nos animais que receberam a profilaxia com o extrato de própolis foi capaz de mudar a história da doença aumentando a expectativa de vida.

A literatura é vasta quanto aos mecanismos de ação da própolis e seus compostos, nesse trabalho mostramos que ao usarmos a própolis de forma profilática ela foi capaz de aumentar a expectativa de vida dos camundongos com sepse por meio da preservação do parênquima pulmonar. Quando se fala em abordagem terapêutica em pacientes com sepse se preconiza o início precoce de antibioticoterapia, por se tratar de uma síndrome de evolução aguda e extremamente grave é inovador uma terapia que modifique a história natural da doença por meio do efeito de modulação do processo inflamatório. Os mecanismos de preservação tecidual devem seguir em investigação a fim de encontrar novos alvos terapêuticos que reduzam a mortalidade ainda alta da sepse.

7. Conclusões

- O Extrato Padronizado de Própolis Apis Flora foi capaz de aumentar a expectativa de vida em camundongos com sepse induzida por CLP quando comparado ao grupo controle.
- A profilaxia com EPPAF não foi capaz de reduzir as Unidades Formadoras de Colônias no pulmão, sangue e peritônio dos animais com sepse induzida por CLP.
- O EPPAF não alterou os parâmetros de coagulação nem a contagem total de plaquetas.
- O EPPAF não impactou de forma significativa na contagem de células da medula e do sangue periférico, mas foi capaz de reduzir a contagem total de células do peritônio.
- Animais que receberam a profilaxia com EPPAF tiveram redução da hemorragia e da necrose tecidual do tecido pulmonar no histopatológico. Uma maior preservação do parênquima pulmonar influencia diretamente na sobrevivência, visto que a falência respiratória é uma das principais complicações da sepse.

Referências

- ABDULKHANI A, HOSSEINZADEH J, ASHORI A, ESMAEELI H, . Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/poly(lactic acid) composites coated with ethanolic extract of propolis. *Polymer Composites*, 38: 13–19; 2017.
- AJROUCHE R, AL-HAJJE A, EL-HELOU N, AWADA S, RACHIDI S, ZEIN S, SALAMEH P, . Statins decrease mortality in Lebanese patients with sepsis: A multicenter study. *Pharmacy practice*, 11: 102; 2013.
- ALBAIDI R, BASU RK, GOLDSTEIN SL, BAGSHAW SM, . Sepsis-associated acute kidney injury. *Seminars in nephrology*. Anais...Elsevier2015
- ANGUS DC, VAN DER POLL T, . Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369: 840–851; 2013.
- ANSORGE S, REINHOLD D, LENDECKEL U, . Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58: 580–589; 2003.
- ARAÚJO MAR, LIBÉRIO SA, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF, . Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: A brief review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22: 208–219; 2011.
- AYALA A, SONG GY, CHUNG C-S, REDMOND KM, CHAUDRY IH, . Immune depression in polymicrobial sepsis: the role of necrotic (injured) tissue and endotoxin. *Critical care medicine*, 28: 2949–2955; 2000.
- BACHIEGA TF, ORSATTI CL, PAGLIARONE AC, SFORCIN JM, . The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. *Phytotherapy Research*, 26: 1308–1313; 2012.
- BANKOVA V, . Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100: 114–117; 2005.
- BARLAK Y, DEĞER O, ÇOLAK M, KARATAYLI SC, BOZDAYI AM, YÜCESAN F, . Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome science*, 9: 1–11; 2011.
- BAROCHIA A V, CUI X, VITBERG D, SUFFREDINI AF, O'GRADY NP, BANKS SM, MINNECI P, KERN SJ, DANNER RL, NATANSON C, . Bundled care for septic shock: an analysis of clinical trials. *Critical care medicine*, 38: 668; 2010.
- BENJAMIM CF, SILVA JS, FORTES ZB, OLIVEIRA MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ, . Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infection and immunity*, 70: 3602–3610; 2002.
- BERRETTA AA, DE CASTRO PA, CAVALHEIRO AH, FORTES VS, BOM VP, NASCIMENTO AP, MARQUELE-OLIVEIRA F, PEDRAZZI V, RAMALHO LNZ, GOLDMAN GH, . Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013: 2013.
- BERRETTA AA, SILVEIRA MAD, CAPCHA JMC, DE JONG D, . Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110622; 2020.

- BONE RC, BALK RA, CERRA FB, DELLINGER RP, FEIN AM, KNAUS WA, SCHEIN RMH, SIBBALD WJ, . Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101: 1644–1655; 1992.
- BORRELLI F, MAFFIA P, PINTO L, IANARO A, RUSSO A, CAPASSO F, IALENTI A, . Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 73: S53–S63; 2002.
- BOSIO K, AVANZINI C, D’AVOLIO A, OZINO O, SAVOIA D, . In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in applied microbiology*, 31: 174–177; 2000.
- BRAGA FILHO JAF, ABREU AG, RIOS CEP, TROVÃO LO, SILVA DLF, CYSNE DN, NASCIMENTO JR, FORTES TS, SILVA LA, GUERRA RNM, . Prophylactic treatment with simvastatin modulates the immune response and increases animal survival following lethal sepsis infection. *Frontiers in immunology*, 9: 2137; 2018.
- BÚFALO MC, FIGUEIREDO AS, DE SOUSA JPB, CANDEIAS JMG, BASTOS JK, SFORCIN JM, . Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of applied microbiology*, 107: 1669–1680; 2009.
- BURAS JA, HOLZMANN B, SITKOVSKY M, . Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 854–865; 2005.
- BURKOVSKIY I, SARDINHA J, ZHOU J, LEHMANN C, . Cytokine release in sepsis. *Advances in bioscience and biotechnology*, 4: 860; 2013.
- CAPOCI IRG, BONFIM-MENDONÇA P DE S, ARITA GS, PEREIRA RR DE A, CONSOLARO MEL, BRUSCHI ML, NEGRI M, SVIDZINSKI TIE, . Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 2015.
- CHUNG Y-J, JARVIS B, PESTKA J, . Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production by satratoxins and other macrocyclic trichothecenes in the murine macrophage. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 66: 379–391; 2003.
- CONTI BJ, SANTIAGO KB, BÚFALO MC, HERRERA YF, ALDAY E, VELAZQUEZ C, HERNANDEZ J, SFORCIN JM, . Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67: 1431–1438; 2015.
- DA SILVA LEITAO DP, DA SILVA FILHO AA, POLIZELLO ACM, BASTOS JK, SPADARO ACC, . Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27: 1834–1839; 2004.
- DANAI PA, SINHA S, MOSS M, HABER MJ, MARTIN GS, . Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. *Critical care medicine*, 35: 410–415; 2007.
- DE CASTRO PA, BOM VLP, BROWN NA, DE ALMEIDA RSC, RAMALHO LNZ, SAVOLDI M, GOLDMAN MHS, BERRETTA AA, GOLDMAN GH, . Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, 60: 74–86; 2013.

DENNING N-L, AZIZ M, GURIEN SD, WANG P, . Damps and nets in sepsis. *Frontiers in immunology*, 10: 2536; 2019.

DHAINAUT JF, SHORR AF, MACIAS WL, KOLLEF MJ, LEVI M, REINHART K, NELSON DR, . Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: Relationship with mortality and organ failure. *Critical Care Medicine*, 33: 341–348; 2005.

ERICKSON SE, MARTIN GS, DAVIS JL, MATTHAY MA, EISNER MD, . Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Critical care medicine*, 37: 1574; 2009.

FARIAS JHC DE, REIS AS, ARAÚJO MAR, ARAÚJO MJAM, ASSUNÇÃO AKM, FARIAS JC DE, FIALHO EMS, SILVA LA, COSTA GC, GUERRA RNM, . Effects of stingless bee propolis on experimental asthma. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 2014.

FARNESI AP, AQUINO-FERREIRA R, JONG D DE, BASTOS JK, SOARES AEE, . Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*, 8: 635–640; 2009.

FERNANDES JR A, SUGIZAKI MF, FOGO ML, FUNARI SRC, LOPES CAM, . In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of venomous Animals and Toxins*, 1: 63–69; 1995.

FERNANDES JÚNIOR A, LOPES MMR, COLOMBARI V, MONTEIRO ACM, VIEIRA EP, . Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*, 36: 294–297; 2006.

FERRER R, MARTIN-LOECHES I, PHILLIPS G, OSBORN TM, TOWNSEND S, DELLINGER RP, ARTIGAS A, SCHORR C, LEVY MM, . Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Critical care medicine*, 42: 1749–1755; 2014.

FLEISCHMANN C, SCHERAG A, ADHIKARI NKJ, HARTOG CS, TSAGANOS T, SCHLATTMANN P, ANGUS DC, REINHART K, . Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 193: 259–272; 2016.

GARNACHO-MONTERO J, ALDABO-PALLAS T, GARNACHO-MONTERO C, CAYUELA A, JIMÉNEZ R, BARROSO S, ORTIZ-LEYBA C, . Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. *Critical Care*, 10: 1–12; 2006.

GEROULANOS S, DOUKA ET, . Historical perspective of the word “sepsis”. *Intensive care medicine*, 32: 2077; 2006.

GUPTA M, MAZUMDER UK, RATH N, MUKHOPADHYAY DK, . Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich ascites carcinoma. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 151–156; 2000.

GUPTA S, SAKHUJA A, KUMAR G, MCGRATH E, NANCHAL RS, KASHANI KB, . Culture-negative severe sepsis: nationwide trends and outcomes. *Chest*, 150: 1251–1259; 2016.

HARMANKAYA M, ORESKOV JO, BURCHARTH J, GÖGENUR I, . The impact of timing of antibiotics on in-hospital outcomes after major emergency abdominal surgery. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 46: 221–227; 2020.

- HENDERSON RF, . Use of bronchoalveolar lavage to detect respiratory tract toxicity of inhaled material. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 155–159; 2005.
- HERRIDGE MS, CHEUNG AM, TANSEY CM, MATTE-MARTYN A, DIAZ-GRANADOS N, AL-SAIDI F, COOPER AB, GUEST CB, MAZER CD, MEHTA S, . One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348: 683–693; 2003.
- HOTCHKISS RS, KARL IE, . The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England journal of medicine*, 348: 138–150; 2003.
- HU F, HEPBURN HR, LI Y, CHEN M, RADLOFF SE, DAYA S, . Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of ethnopharmacology*, 100: 276–283; 2005.
- HUANG CY, DANIELS R, LEMBO A, HARTOG C, O'BRIEN J, HEYMANN T, REINHART K, NGUYEN HB, (SSEP) SSEP, . Life after sepsis: an international survey of survivors to understand the post-sepsis syndrome. *International journal for quality in health care*, 31: 191–198; 2019.
- ISCIMEN R, YILMAZ M, CARTIN-CEBA R, HUBMAYR R, AFESSA B, GAJIC O, FARMER J, . Risk factors for the development of acute lung injury in patients with septic shock: an observational cohort study. *Critical Care*, 12: 1; 2008.
- KAUKONEN K-M, BAILEY M, SUZUKI S, PILCHER D, BELLOMO R, . Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *Jama*, 311: 1308–1316; 2014.
- KINASEWITZ GT, ZEIN JG, LEE GL, NAZIR SA, TAYLOR FB, . Prognostic value of a simple evolving disseminated intravascular coagulation score in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 33: 2214–2221; 2005.
- KOBAYASHI SD, DELEO FR, . Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1: 309–333; 2009.
- KORISH AA, ARAFA MM, . Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15: 332–338; 2011.
- KUJUMGIEV A, TSVETKOVA I, SERKEDJIEVA Y, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S, . Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235–240; 1999.
- KUMAR A, ELLIS P, ARABI Y, ROBERTS D, LIGHT B, PARRILLO JE, DODEK P, WOOD G, KUMAR A, SIMON D, . Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 136: 1237–1248; 2009.
- KUMAZAWA S, HAMASAKA T, NAKAYAMA T, . Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84: 329–339; 2004.
- KWAK B, MULHAUPT F, MYIT S, MACH F, . Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nature medicine*, 6: 1399–1402; 2000.
- LAGU T, ROTHBERG MB, SHIEH M-S, PEKOW PS, STEINGRUB JS, LINDENAUER PK, . Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007.

Critical care medicine, 40: 754–761; 2012.

LALLO MA, SANTOS MJ DOS, BONDAN EF, . Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. *Revista de Saúde Pública*, 36: 621–626; 2002.

LEVY MM, EVANS LE, RHODES A, . The surviving sepsis campaign bundle: 2018 update. *Intensive care medicine*, 44: 925–928; 2018.

LEVY MM, FINK MP, MARSHALL JC, ABRAHAM E, ANGUS D, COOK D, COHEN J, OPAL SM, VINCENT J-L, RAMSAY G, . 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive care medicine*, 29: 530–538; 2003.

LI L, SUN W, WU T, LU R, SHI B, . Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathway. *European journal of pharmacology*, 794: 61–68; 2017.

LIBERIO SA, PEREIRA ALA, DUTRA RP, REIS AS, ARAÚJO MJAM, MATTAR NS, SILVA LA, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF, GUERRA RNM, . Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11: 1–10; 2011.

MACHADO JL, ASSUNÇÃO AKM, DA SILVA MCP, REIS AS DOS, COSTA GC, ARRUDA D DE S, ROCHA BA, VAZ MM DE OLL, PAES AM DE A, GUERRA RNM, . Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 2012.

MACIEL MCG, FARIAS JC, MALUF MJ, GOMES EA, PEREIRA PVS, ARAGÃO-FILHO WC, FRAZÃO JB, COSTA GC, SOUSA SM, SILVA LA, . *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 8: 1–7; 2008.

MARTIN GS, MANNINO DM, EATON S, MOSS M, . The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, 348: 1546–1554; 2003.

MARTÍNEZ ML, PLATA-MENCHACA EP, RUIZ-RODRÍGUEZ JC, FERRER R, . An approach to antibiotic treatment in patients with sepsis. *Journal of thoracic disease*, 12: 1007; 2020.

MEDURI GU, HEADLEY S, KOHLER G, STENTZ F, TOLLEY E, UMBERGER R, LEEPER K, . Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS: Plasma IL-1 β and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*, 107: 1062–1073; 1995.

MILLER LS, CHO JS, . Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nature Reviews Immunology*, 11: 505–518; 2011.

MOLTENI M, GEMMA S, ROSSETTI C, . The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. *Mediators of inflammation*, 2016, 2016.

NIMAH M, BRILLI RJ, . Coagulation dysfunction in sepsis and multiple organ system failure. *Critical Care Clinics*, 19: 441–458; 2003.

OLIVEIRA AS, NASCIMENTO JR, TROVAO LO, ALVES PCS, MACIEL MCG, SILVA

LDM, MARQUES AA, SANTOS APSA, SILVA LA, NASCIMENTO FRF, . The anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* L. increases the lifespan of diabetic mice with lethal sepsis. *Journal of ethnopharmacology*, 236: 345–353; 2019.

ORSATTI CL, MISSIMA F, PAGLIARONE AC, BACHIEGA TF, BÚFALO MC, ARAÚJO JR JP, SFORCIN JM, . Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, 24: 1141–1146; 2010a.

ORSATTI CL, MISSIMA F, PAGLIARONE AC, SFORCIN JM, . Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 129: 314–318; 2010b.

PARK I, KIM M, CHOE K, SONG E, SEO H, HWANG Y, AHN J, LEE SH, LEE JH, JO YH, KIM K, KOH GY, KIM P, . Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. *European Respiratory Journal*, 53; 2019.

PAULINO N, ABREU SRL, UTO Y, KOYAMA D, NAGASAWA H, HORI H, DIRSCH VM, VOLLMAR AM, SCREMIN A, BRETZ WA, . Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of Pharmacology*, 587: 296–301; 2008.

PIÑEROS AR, DE LIMA MHF, RODRIGUES T, GEMBRE AF, BERTOLINI TB, FONSECA MD, BERRETTA AA, RAMALHO LNZ, CUNHA FQ, HORI JI, . Green propolis increases myeloid suppressor cells and CD4⁺ Foxp3⁺ cells and reduces Th2 inflammation in the lungs after allergen exposure. *Journal of ethnopharmacology*, 252: 112496; 2020.

PINTO MS, FARIA JE DE, CASSINI STA, PEREIRA CS, GIOSO MM, . Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38: 278–283; 2001.

PLATA-MENCHACA EP, FERRER R, . Life-support tools for improving performance of the Surviving Sepsis Campaign Hour-1 bundle. *Med Intensiva*, 42: 547–550; 2018.

RANIERI VM, THOMPSON BT, BARIE PS, DHAINAUT J-F, DOUGLAS IS, FINFER S, GÅRDLUND B, MARSHALL JC, RHODES A, ARTIGAS A, . Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *New England Journal of Medicine*, 366: 2055–2064; 2012.

RHEE C, DANTES R, EPSTEIN L, MURPHY DJ, SEYMOUR CW, IWASHYNA TJ, KADRI SS, ANGUS DC, DANNER RL, FIORE AE, . Incidence and trends of sepsis in US hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. *Jama*, 318: 1241–1249; 2017.

RIOS 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. *Frontiers in microbiology*, 8: 148; 2017.

ROJAS M, WOODS CR, MORA AL, XU J, BRIGHAM KL, . Endotoxin-induced lung injury in mice: Structural, functional, and biochemical responses. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288: 333–341; 2005.

SALATINO A, TEIXEIRA ÉW, NEGRI G, MESSAGE D, . Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 33–38; 2005.

SCUMPIA PO, MCAULIFFE PF, O'MALLEY KA, UNGARO R, UCHIDA T, MATSUMOTO T, REMICK DG, CLARE-SALZLER MJ, MOLDAWER LL, EFRON PA, . CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *The Journal of Immunology*, 175: 3282–3286; 2005.

SEGAL AW, . How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, 23: 197–223; 2005.

SERAFIM R, GOMES JA, SALLUH J, PÓVOA P, . A comparison of the quick-SOFA and systemic inflammatory response syndrome criteria for the diagnosis of sepsis and prediction of mortality: a systematic review and meta-analysis. *Chest*, 153: 646–655; 2018.

SEYMOUR CW, LIU VX, IWASHYNA TJ, BRUNKHORST FM, REA TD, SCHERAG A, RUBENFELD G, KAHN JM, SHANKAR-HARI M, SINGER M, . Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, 315: 762–774; 2016.

SFORCIN JM, . Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 113: 1–14; 2007.

SFORCIN JM, BANKOVA V, . Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of ethnopharmacology*, 133: 253–260; 2011.

SFORCIN JM, FERNANDES JR A, LOPES CAM, BANKOVA V, FUNARI SRC, . Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 73: 243–249; 2000.

SFORCIN JM, FERNANDES JÚNIOR A, LOPES CAM, FUNARI SRC, BANKOVA V, . Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 7: 139–144; 2001.

SILVEIRA MAD, CAPCHA JMC, SANCHES TR, DE SOUSA MOREIRA R, GARNICA MS, SHIMIZU MH, BERRETTA A, TELES F, NORONHA IL, ANDRADE L, . Green propolis extract attenuates acute kidney injury and lung injury in a rat model of sepsis. *Scientific Reports*, 11: 1–11; 2021.

SILVEIRA MAD, TELES F, BERRETTA AA, SANCHES TR, RODRIGUES CE, SEGURO AC, ANDRADE L, . Effects of Brazilian green propolis on proteinuria and renal function in patients with chronic kidney disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC nephrology*, 20: 1–12; 2019.

SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, SHANKAR-HARI M, ANNANE D, BAUER M, BELLOMO R, BERNARD GR, CHICHE J-D, COOPERSMITH CM, . The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*, 315: 801–810; 2016.

SOARES AC, . Potencial terapêutico do extrato de própolis na sepse experimental. 2014.

SPRUNG CL, ANNANE D, KEH D, MORENO R, SINGER M, FREIVOGEL K, WEISS YG, BENBENISHTY J, KALENKA A, FORST H, . Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *New England Journal of Medicine*, 358: 111–124; 2008.

STEPANOVIĆ S, ANTIĆ N, DAKIĆ I, ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ M, . In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, 158: 353–357; 2003.

TAKEUCHI O, AKIRA S, . Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140: 805–

820; 2010.

TAN-NO K, NAKAJIMA T, SHOJI T, NAKAGAWASAI O, NIJIMA F, ISHIKAWA M, ENDO Y, SATO T, SATOH S, TADANO T, . Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 96–99; 2006.

VINCENT J-L, . Emerging therapies for the treatment of sepsis. *Current opinion in anaesthesiology*, 28: 411–416; 2015.

WARE LB, MATTHAY MA, . The acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 342: 1334–1349; 2000.

WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH, . Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*, 29: 189–201; 1980.

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

XUAN H, ZHU R, LI Y, HU F, . Inhibitory effect of chinese propolis on phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity in vascular endothelial cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011; 2010.

YATACO AC, JAEHNE AK, RIVERS EP, . Protocolized early sepsis care is not only helpful for patients: it prevents medical errors. *Critical care medicine*, 45: 464–472; 2017.

YUAN Y, ALWIS I, WU MCL, KAPLAN Z, ASHWORTH K, BARK D, PHAM A, MCFADYEN J, SCHOENWAELDER SM, JOSEFSSON EC, . Neutrophil macroaggregates promote widespread pulmonary thrombosis after gut ischemia. *Science Translational Medicine*, 9: 2017.

ZHANG D, MICEK ST, KOLLEF MH, . Time to appropriate antibiotic therapy is an independent determinant of postinfection ICU and hospital lengths of stay in patients with sepsis. *Critical care medicine*, 43: 2133–2140; 2015.

ZHENG Y-Z, DENG G, LIANG Q, CHEN D-F, GUO R, LAI R-C, . Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. *Scientific reports*, 7: 1–11; 2017.

Anexos
ANEXO I



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito da polarização de macrófagos por agentes infecciosos, tumores e imunomoduladores naturais sobre a susceptibilidade de hospedeiros em diferentes modelos experimentais" registrada com o nº 23115.003819/2016-11, sob a responsabilidade de Flávia Raquel Fernandes do Nascimento que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado Aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 07/06/2016.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	4 ANOS
Espécie/inhagem/raça	<i>Mus musculus</i> (camundongo) / Balb/c C57B/6 e Swiss
Nº de animais	600
Peso/idade	20-30g / 3-4 meses
Sexo	Machos / fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Lucilene Amorim Silva

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