



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ – CCIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA**

TATIELLE GOMES DIAS

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE BEBIDAS
MISTAS PROBIÓTICAS EM MODELO DE INFECÇÃO**

IMPERATRIZ
2023

TATIELLE GOMES DIAS

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE BEBIDAS
MISTAS PROBIÓTICAS EM MODELO DE INFECÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Saúde e Tecnologia. Linha de Pesquisa: Tecnologias em Saúde

Orientadora: Dra. Márcia Cristina Gonçalves Maciel

Coorientador: Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis

IMPERATRIZ
2023

Serviços da Biblioteca da Universidade Federal do Maranhão

Gomes Dias, Tatielle.

AVALIAÇÃO IN VIVO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE
BEBIDAS MISTAS PROBIÓTICAS EM MODELO DE INFECÇÃO /
Tatielle Gomes Dias. - 2023.

112 p.

Coorientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Orientador(a): Márcia Cristina Goncalves Maciel.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Tecnologia/ccim, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, 2023.

1. Babaçu. 2. Buriti. 3. Caju. 4. Probióticos. 5.
Sepse. I. Cristina Goncalves Maciel, Márcia. II. Silva
dos Reis, Aramys. III. Título.

TATIELLE GOMES DIAS

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE BEBIDAS
MISTAS PROBIÓTICAS EM MODELO DE INFECÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Tecnologia. Área de concentração: Saúde e Tecnologia. Linha de Pesquisa: Tecnologias em Saúde

Aprova do em:08/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Márcia Cristina Goncalves Maciel (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Aramys Silva Reis (Coorientador)

Universidade Federal do Maranhão

Profª. Dra. Elizabeth Soares Fernandes (Titular)

Faculdade Pequeno Príncipe (FPP)

Profª. Dr. Silvia Ribeiro de Souza (Titular)

Universidade de Brasília (UnB)

Dedicatória

“Dedico este trabalho a Deus que me deu oportunidades para que meus sonhos fossem realizados, e que me deu forças em todos os momentos difíceis. Dedico também aos meus pais, a quem eu tanto admiro, minha mãe Maria e meu pai Geová, que tanto se esforçaram para me dar ensino, todo o meu esforço é por vocês para que um dia eu possa ser alguém tão bom e digno quanto os dois, dedico ao meu avô José que infelizmente faleceu, mas que sei que está muito orgulhoso de quem estou me tornando e por fim e não menos importante ao meu marido Marcos, quem sofreu e passou de perto essa jornada comigo, sempre ao meu lado”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que tem me guiado e iluminado minha trajetória até aqui, uma jornada que não tem sido fácil mais me lembro todos os dias do orar ao Senhor pedindo uma oportunidade. Agradeço ao meus queridos pais, Maria das Dores Gomes Dias e Geová Dias Ferreira, tenho orgulho de poder dar o retorno no qual eles tanto investiram, só tenho a agradecer o tanto que fizeram por mim, tudo que sou e serei um dia é graças ao esforço dos dois, ambos não tiveram a oportunidade de estudar e lutaram para que eu pudesse realizar esse sonho, então meu maior e eterno agradecimento é a eles.

Agradeço também ao meu marido Marcos Farias Carneiro, meu companheiro, que está lutando para conquistar meus sonhos junto comigo, a todas as vezes que você teve que se esforçar e passar o fim de semana comigo no laboratório, a todas as noites que você me consolou quando chorei por não está aguentando, a todos os sorrisos e satisfação ao conquistar algo novo no mestrado, ao tempo que passei longe e que cuidou de mim mesmo de longe.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia, assim como os professores do corpo docente, que conduziram de forma admirável o curso. A minha Orientadora Profa. Dra. Márcia Cristina Goncalves Maciel a quem sempre pude contar e aprender, e que me deu a Honra de ser sua orientada, uma mulher forte e com um conhecimento admirável. Ao meu querido Coorientador Prof. Dr. Aramys Silva, dos Reis, que me ensinou, me corrigiu me aconselhou e que me deu muitas oportunidades, sou grata por ter compartilhado esse período com alguém tão notável e que me ensinou a ser uma pesquisadora de verdade.

Aos professores participantes da banca examinadora Ana Lúcia Fernandes Pereira, André Alvares Marques Vale, os suplentes, Queli Cristina Fidelis, Monique Santos do Carmo pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões. Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, por ceder a infraestrutura para a realização experimento da minha dissertação in vivo com sepse, e aos amigos Priscila Mendonça Mendes, Régis Farias, Caroline Martins e André Vale. Aos parceiros e amigos dos laboratórios de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica; Efraim Pereira, Sara e demais colegas. A Agências de fomento CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

A sepse é uma síndrome que ainda representa um grave problema de saúde pública mundial, levando a morte de milhares de pessoas. Os tratamentos antimicrobianos existentes para sepse, são insuficientes, pois concentram-se exclusivamente na ação direta ao patógeno, deixando de lado a importante questão de aliviar a inflamação no paciente. Dessa forma, é necessário explorar novas abordagens terapêuticas que buscam aliviar a inflamação sistêmica, e que consigam reestabelecer o microbioma intestinal na qual já foi demonstrado estar em desequilíbrio durante a sepse. Nosso objetivo foi verificar se as bebidas mistas probióticas a base do lextrato hidrossolúvel de babaçu com adição dos frutos caju ou buriti é capaz de modular a microbiota de camundongos infectados, reestabelecendo o desequilíbrio promovido pela sepse e, consequentemente, modulando o sistema imunológico. A dissertação foi delineada em 3 capítulos. O capítulo I trata-se de um revisão integrativa já publicada como o título: Atividade imunomoduladora de probióticos em modelos de infecções bacterianas, já no experimental *in vivo* realizado através da indução da sepse sub-letal por Ligadura e Punção Cecal (CLP) em camundongos Swiss, após a realização prévia do tratamento profilático por 15 dias foram delineados dois artigos, o capítulo II com o título: Efeito Imunomodulador da Bebida Mista Probiótica de Babaçu e Caju em Camundongos Sépticos e capítulo III: Efeito Imunomodulador da Bebida Mista Probiótica de Babaçu e Buriti em Camundongos Sépticos. Em relação aos estudos experimentais os animais apresentaram-se distribuídos em 4 animais por grupo, os grupos analisados foram, infecção sem tratamento (CLP), bebida mista probiótica de babaçu+caju (PBC), bebida mista probiótica de babaçu+buriti (PBB), infectado e tratado com a bebida mista probiótica de babaçu+caju (CLP+PBC) e infectado e tratado com a bebida mista probiótica de babaçu+caju (CLP+PBB). O tratamento com PBC mediante a infecção diminuiu a disseminação polimicrobiana para o sangue, diminuiu a infiltração pulmonar e reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-17A. Já no tratamento com PBB durante o processo infeccioso, assim como no tratamento com caju, houve uma redução da disseminação polimicrobiana no sangue, acompanhada de uma diminuição no infiltrado inflamatório no Lavado broncoalveolar (LBA), das citocinas avaliadas apenas TNF- α foi diminuída. Em conclusão, nosso estudo evidenciou que duas bebidas mistas probióticas possuem propriedades imunomoduladoras e são capazes de reduzir a disseminação de microorganismos para o sangue durante a sepse induzida por CLP em camundongos. Os dados obtidos são promissores e fornecem subsídios para um tratamento complementar alternativo para a sepse, que atenderá o público em geral. Além disso as bebidas podem fornecerem o retorno socioeconômico fomentando o mercado regional.

Palavras-chaves: Probióticos, Babaçu, Caju, Buriti, Sepse, Imunomodulação.

ABSTRACT

Sepsis is a syndrome that still represents a serious global public health problem, leading to the death of thousands of people. Existing antimicrobial treatments for sepsis are inadequate as they focus solely on direct pathogen action, overlooking the crucial issue of alleviating inflammation in the patient. Therefore, it is necessary to explore new therapeutic approaches that aim to alleviate systemic inflammation and restore the intestinal microbiome, which has been shown to be imbalanced during sepsis. Our goal was to investigate whether probiotic-rich beverages based on water-soluble babassu extract with the addition of cashew or buriti fruits can modulate the microbiota of infected mice, restoring the imbalance caused by sepsis, and consequently, modulating the immune system. The dissertation was structured into three chapters. Chapter I is an integrative review already published with the title: Immunomodulatory Activity of Probiotics in Bacterial Infection Models. In the *in vivo* experimental phase, induced through sub-lethal sepsis by Cecal Ligation and Puncture (CLP) in Swiss mice, following a prior 15-day prophylactic treatment, two articles were outlined: Chapter II titled “Immunomodulatory Effect of Probiotic Beverage from Babassu and Cashew in Septic Mice” and Chapter III: “Immunomodulatory Effect of Probiotic Beverage from Babassu and Buriti in Septic Mice”. Regarding the experimental studies, the animals were distributed into groups of 4 animals each. The analyzed groups were: infection without treatment (CLP), probiotic beverage from babassu+cashew (PBC), probiotic beverage from babassu+buriti (PBB), infected and treated with probiotic beverage from babassu+cashew (CLP+PBC), and infected and treated with probiotic beverage from babassu+buriti (CLP+PBB). Treatment with PBC during infection reduced polymicrobial dissemination to the blood, decreased lung infiltration, and reduced levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-17A. In the PBB treatment during the infectious process, similar to the cashew treatment, there was a reduction in polymicrobial dissemination in the blood, accompanied by a decrease in the inflammatory infiltrate in the bronchoalveolar lavage (BAL), with only TNF- α showing a decrease among the evaluated cytokines. In conclusion, our study demonstrated that two probiotic-rich beverages have immunomodulatory properties and are capable of reducing microbial dissemination to the blood during CLP-induced sepsis in mice. The obtained data are promising and provide support for an alternative complementary treatment for sepsis that can benefit the general public. Additionally, these beverages may contribute to socio-economic returns by stimulating the regional market.

Keywords: Probiotics, Babassu, Cashew, Buriti, Sepsis, Immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERÊNCIAL TEÓRICO

| | |
|---|----|
| Figura 1- A inter-relação entre síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse e infecção..... | 17 |
| Figura 2- A complexa patogênese da sepse..... | 22 |
| Figura 3- Demonstração do modelo de ligadura e punção Cecal em ratos..... | 29 |
| Figura 4- Microbiota intestinal..... | 31 |
| Figura 5- Divisões do Babaçu..... | 44 |
| Figura 6- Divisão do caju..... | 46 |
| Figura 7- (A) buritizeiro, (B) fruto (formato externo) e (C) fruto (formato interno..... | 48 |

CAPÍTULO I (ANEXO)

| | |
|--|-----|
| Figura 1- PRISMA Included article selection flowchart..... | 117 |
| Figura 2- Mechanisms of action of probiotics against Salmonella infection..... | 117 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Figura 1- Unidades Formadora de Colônias (CFU) /mL em Ágar Mueller Hinton..... | 77 |
| Figura 2- Unidades Formadora de Colônias (CFU) /mL em Ágar MacConkey..... | 78 |
| Figura 3- Infiltrado inflamatório para cavidade peritoneal..... | 79 |
| Figura 4- Contagem total de células..... | 80 |
| Figura 5- Dosagem de citocinas do soro..... | 81 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|-----|
| Figura 1- Unidades Formadora de Colônias (CFU) /mL em Ágar Mueller Hinton..... | 102 |
| Figura 2- Unidades Formadora de Colônias (CFU) /mL em Ágar MacConkey..... | 103 |
| Figura 3- Dosagem de citocinas do soro..... | 104 |
| Figura 4- Contagem total de células..... | 105 |
| Figura 5- Contagem diferencial de células na cavidade peritoneal..... | 106 |

LISTA DE TABELAS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Tabela 1- Pontuação de avaliação de falha de órgão sequencial [relacionada à sepse]. Critério SOFA (originally the Sepsis-related Organ Failure Assessment) predisõem pontuação de 0-4.....18

Tabela 2- Nomenclatura atualizada para probióticos de acordo com a RDC 241, de 2018.....37

Tabela 3- Exemplos de produtos probióticos de frutas e vegetais.....41

CAPÍTULO I (ANEXO)

Table 1-Distribution of selected publications according to formulation, probiotics, dose/concentration, administration time, experimental model, type of treatment, activity and references.....117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|--|
| ACC | Colégio Americano de Médicos do tórax |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CBA | Matriz de esferas citométricas |
| CD4+ | Linfócitos T CD4 |
| CD8+ | Linfócitos T CD8 |
| CD80 | Cluster de Diferenciação 80 |
| CD86 | Cluster de Diferenciação 86 |
| CEUA | Comitê de Ética no Uso de Animais |
| CLP | Ligadura e Punção Cecal |
| CLP+PBB | Bebida Mista Probiótica de Babaçu e Buriti fermentada + Infecção |
| CLP+PBC | Bebida Mista Probiótica de Leite de Babaçu e Caju +Infecção |
| CLRs | Receptores de Carboidratos (CLRs) |
| DAMPs | Padrões Moleculares Associados ao Danos |
| ETC | Cadeia de Transporte de Elétrons |
| EUA | Estados Unidos |
| FiO ₂ | Fração Inspirada de Oxigênio |
| GBD | Carga Global de Doenças |
| HbA1c | Hemoglobina A1c |
| HLA-DR | Antígenos Leucocitários Humano- isotipo DR) |
| HOMA-IR | Modelo de Avaliação da Homeostase de Resistência à Insulina |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-17 | Interleucina 17 |
| IL-17 ^a | Interleucina 17A |
| IL-1 α | Interleucina 1 α |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| IL-2 | Interleucina 2 |

| | |
|-------------------|---|
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina |
| INF- γ | Interferon-gama |
| LBA | Lavado Broncoalveolar |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Densidade |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MCP-1 | Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 |
| MD-2 | Fator de Diferenciação Mielóide 2 |
| mmHg | Milímetro de mercúrio |
| NETs | Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos |
| NF- κ B | Factor Nuclear kappa B |
| NLRs | Receptores do tipo NOD |
| NO | Óxido Nítrico |
| NRRL | Coleção de Cultura do Serviço de Pesquisa Agrícola |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PaCO ₂ | Pressão parcial de oxigênio |
| PAM | Pressão Arterial Média |
| PAMPs | Padrões Moleculares Associados ao Patógeno |
| PBB | Bebida Probiótica do Bebida Mista Probiótica de Babaçu e Buriti |
| PBB | Bebida Probiótica do Extrato do Babaçu+Buriti fermentada sem infecção |
| PBC | Bebida Mista Probiótica de Leite de Babaçu e Caju |
| PRRs | Receptores de Reconhecimento de Padrões |
| qSOFA | Quick SOFA |
| QUICKI | Índice Quantitativo de Verificação de Sensibilidade à Insulina |
| RLRs | Receptores RIG-I-Like |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| rRNA | Ácido Ribonucleico Ribossômico, |
| SCCM | Sociedade de medicina intensiva |
| SCFA | Ácidos Graxos de Cadeia Curta |
| SDRA | Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo |
| SIRS | Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica |

| | |
|---------------|---|
| SOFA | Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos Relacionada à Sepsis |
| Th17 | Linfócitos T auxiliares 17 |
| TLRs | Receptores Toll-Like (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10). |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| TOTG | Teste Oral de Tolerância à Glicose |
| Treg | Linfócitos T Reguladores |
| SCFA | Ácidos Graxos de Cadeia Curta |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônia |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVO | 15 |
| 2.1 Objetivos específicos | 15 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 3.1 Sepse | 16 |
| 3.1.1 Definição | 16 |
| 3.1.2 Epidemiologia | 20 |
| 3.1.3 Patogênese da sepse | 21 |
| 3.1.4 Modelos de indução de sepse | 27 |
| 3.2 Microbiota | 30 |
| 3.3 Relação entre o microbioma intestinal e a sepse | 32 |
| 3.4 Probióticos | 34 |
| 3.5 Frutas da região semiárida maranhense | 42 |
| 3.5.1 Babaçu | 42 |
| 3.5.2 Caju | 46 |
| 3.5.3 Buriti | 48 |
| 4 REFERÊNCIAS | 50 |
| 5 RESULTADOS | 69 |
| 6 CAPÍTULO I (EM ANEXO) | 69 |
| 7 CAPÍTULO II | 70 |
| 8 CAPÍTULO III | 96 |
| 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 117 |
| 10 ANEXO | 117 |