

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

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO PADRONIZADO
DE PRÓPOLIS (EPP-AF®) NO TRATAMENTO DA SEPSE
INDUZIDA POR *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA EXTRA
INTESTINAL**

ITAYNARA LOBATO DUTRA

São Luís

2023

ITAYNARA LOBATO DUTRA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO PADRONIZADO
DE PRÓPOLIS (EPP-AF®) NO TRATAMENTO DA SEPSE
INDUZIDA POR *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA EXTRA
INTESTINAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Flavia Raquel Fernandes
do Nascimento

São Luís
2023

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

DUTRA, ITAYNARA LOBATO.

POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS EPP-AF® NO TRATAMENTO DA SEPSE INDUZIDA POR ESCHERICHIA COLI PATOGÊNICA EXTRA INTESTINAL / ITAYNARA LOBATO DUTRA. - 2023.

72 f.

Coorientador(a): Flavia Raquel Fernandes Nascimento.
Orientador(a): Afonso Gomes Abreu.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. EPP-AF®. 2. Escherichia coli. 3. Pic. 4. Própolis. 5. Sepsis. I. Abreu, Afonso Gomes. II. Nascimento, Flavia Raquel Fernandes. III. Título.

ITAYNARA LOBATO DUTRA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS
(EPP-AF®) NO TRATAMENTO DA SEPSE INDUZIDA POR *ESCHERICHIA COLI*
PATOGENICA EXTRA INTESTINAL**

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

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Andrea de Souza Monteiro
Universidade CEUMA

Prof^a. Dra. Amanda Silva dos Santos Aliança
Universidade CEUMA

AGRADECIMENTOS

À Deus, o autor e consumidor da minha fé, pois “sem ele nada do que foi feito se fez” (Jo 1:3). Grata sou por Ele ter me sustentado e guiado nessa trajetória e por sempre estar presente nos momentos mais difíceis.

À minha família (esposo Michael J. C. Santos, pai Isaias S. Dutra, mãe M^a Lindinalva L. Dutra, irmão Imaran L. Dutra, irmã Isamara L. Dutra) por estarem sempre ao meu lado, cuidando de mim nos momentos de necessidade, incentivando nos momentos de dificuldade e tolerando nos momentos de desespero.

Ao meu orientador, professor Dr. Afonso Gomes Abreu Junior, pela oportunidade de ingressar neste programa de pós-graduação, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e exemplo de determinação, profissionalismo e companheirismo. Além de orientador, um grande amigo!!!

Aos professores: Dr. Valério Monteiro Neto, Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra Liberio, Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto pela avaliação na banca de qualificação do doutorado, pelas valiosas correções, discussões científicas e grande aprendizado. Aos componentes da banca defesa do doutorado pelo aceite do convite e pelas contribuições de cunho científico com este trabalho.

Aos colaboradores deste projeto de pesquisa (Marcos A. Silva, Beatriz G. Vila Nova, Lucas S. Silva, Athirson R. S. Ares, Caio S. Carvalho, Joyce S. Nunes, Amanda V. S. de Santana, Ivana F. Zafred, Johnny R. Nascimento, Joicy C. de Sá, Andresa A. Berreta, Flávia R. F. Nascimento), sem os quais a execução deste trabalho seria bem mais difícil. Obrigada pelo tempo e esforço dedicado ao nosso experimento.

Ao Laboratório de Patogenicidade Microbiana (LAPMIC) e ao Grupo de Estudos da Patogenicidade Microbiana (GEPat) pelo apoio técnico operacional. Em especial, agradeço aos alunos Marcos A. Silva, Beatriz G. Vila Nova, Lucas S. Silva, Athirson R. S. Ares, Caio S. Carvalho, Joyce S. Nunes, Amanda V. S. de Santana, Ivana F. Zafred, os quais me socorreram em vários momentos e sempre estavam dispostos a ajudar. Vocês são profissionais excelentes e diferenciados; o sucesso é o destino de vocês!!!

Às agências de fomento que financiaram nosso projeto de pesquisa: FAPEMA, CNPQ e a empresa ApisFlora pela parceria constante no estudo da própolis.

RESUMO

A sepse representa um grave problema de saúde pública mundial, com alta taxa de mortalidade e tratamento complexo. Essa síndrome pode ser desencadeada por diversos patógenos, tais como *Escherichia coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) que é capaz de produzir serinoproteases, a exemplo da proteína envolvida na colonização (Pic). Vários papéis biológicos para Pic já foram descritos, incluindo a capacidade de causar sepse letal. A necessidade de conter a evolução da infecção em pacientes acometidos por sepse tem estimulado os centros de pesquisa na descoberta de alvos terapêuticos direcionados ao sistema imunológico para uma resposta efetiva e segura do hospedeiro. Nesse contexto, a própolis pode representar uma alternativa terapêutica devido a sua multiplicidade de aplicações e propriedades biológicas. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial terapêutico do extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) no tratamento da sepse induzida por *Escherichia coli* patogênica extra intestinal. Para isto, foram realizados testes *in vitro* de macrodiluição em caldo e de curva de tempo morte para verificar a atividade antimicrobiana do EPP-AF®. Ensaio *in vivo* também foram realizados para avaliar o potencial do EPP-AF® em controlar a sepse induzida por *E. coli* F5. Para isto, camundongos da linhagem Swiss entre 6-8 semanas foram infectados com *E. coli* F5 e tratados com EPP-AF® de forma profilática e terapêutica, nas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg. Após infecção e tratamento, a sobrevida dos animais foi acompanhada durante 5 dias. Após determinar o tratamento que manteve a maior taxa de sobrevida, os procedimentos de infecção e tratamento foram repetidos para coleta de material biológico destinado a quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), dosagens séricas, quantificações celulares e avaliações histopatológicas. A concentração bactericida mínima (CBM) do EPP-AF® foi 16 mg/mL, com ação bactericida nos primeiros 30 minutos pós-incubação na concentração de 20 mg/mL. O ensaio de sobrevida animal mostrou que o tratamento profilático com EPP-AF® foi mais eficaz e as doses de 200 e 400 mg/kg mantiveram os animais vivos até o final do experimento, nas taxas de 50% e 33%, respectivamente. O EPP-AF® na dose de 200 mg/kg reduziu o número de UFCs no sítio de infecção inicial (cavidade peritoneal) e no fígado, enquanto a dose de 400 mg/kg reduziu o número de UFCs no pulmão. O extrato não induziu alterações histológicas nos órgãos dos animais tratados, nem alterou a quantidade de hemácias, plaquetas ou proteínas plasmáticas. O tratamento com EPP-AF®, entretanto, alterou o perfil sérico de leucócitos dos animais sépticos. Houve um aumento significativo no número de linfócitos e monócitos, e redução de neutrófilos no grupo infectado e tratado profilaticamente com 200 mg/kg de EPP-AF® quando comparado ao grupo infectado. O grupo infectado e tratado profilaticamente com 200 mg/kg de EPP-AF® também apresentou um aumento de células peritoneais em relação ao grupo infectado, o que pode ter contribuído para a redução das UFCs no peritônio. Desse modo, os resultados deste estudo evidenciam o potencial terapêutico do extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) no tratamento da sepse, sendo capaz de reduzir o número de bactérias e aumentar a sobrevida de animais sépticos por meio da modulação da resposta imune.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Pic, sepse, própolis, EPP-AF®.

ABSTRACT

Sepsis represents a serious public health problem worldwide, with a high mortality rate and complex treatment. This syndrome can be triggered by several pathogens, such as extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains (ExPEC) capable of producing serine proteases, such as the protein involved in colonization (Pic). Several biological roles for Pic have already been described, including the ability to cause lethal sepsis. The need to contain the evolution of the infection in patients affected by sepsis has stimulated research centers in the discovery of therapeutic targets aimed at the immune system for an effective and safe host response. In this context, propolis can represent a therapeutic alternative due to its multiplicity of applications and biological properties. The objective of this work was to investigate the therapeutic potential of standardized propolis extract (EPP-AF®) in the treatment of sepsis induced by extra intestinal pathogenic *Escherichia coli*. For this, *in vitro* tests of macrodilution in broth and time-to-death curve were performed to verify the antimicrobial activity of EPP-AF®. *In vivo* assays were also performed to evaluate the potential of EPP-AF® to control sepsis induced by *E. coli* F5. For this, Swiss mice aged between 6-8 weeks were infected with *E. coli* F5 and treated with EPP-AF® prophylactically and therapeutically, at doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg. After infection and treatment, the survival of the animals was followed for 5 days. After determining the treatment that maintained the highest survival rate, the infection and treatment procedures were repeated for the collection of biological material for the quantification of Colony Forming Units (CFU), serum dosages, cellular quantification and histopathological evaluations. The minimum bactericidal concentration (MBC) of EPP-AF® was 16 mg/mL, with bactericidal action in the first 30 minutes after incubation at a concentration of 20 mg/mL. The animal survival showed that the prophylactic treatment with EPP-AF® was more effective, and doses of 200 and 400 mg/kg kept the animals alive until the end of the experiment, at rates of 50% and 33%, respectively. EPP-AF® 200 mg/kg reduced the number of CFUs in the initial site of infection (peritoneal cavity) and in the liver, while the dose of 400 mg/kg reduced the number of CFUs in the lung. The extract did not induce histological changes in the organs of the treated animals or in the amount of red blood cells, platelets or plasmatic proteins. Treatment with EPP-AF®, however, altered the serum profile of leukocytes in septic animals. There was a significant increase in the number of lymphocytes and monocytes, and a reduction in neutrophils in the infected group and treated prophylactically with EPP-AF® 200 mg/kg when compared to the infected group. The infected and treated prophylactically with EPP-AF® 200 mg/kg group also showed an increase in peritoneal cells compared to the infected group, which may have contributed to the reduction of CFUs in the peritoneum. Thus, the results of this study show the therapeutic potential of the standardized extract of propolis (EPP-AF®) in the treatment of sepsis, being able to reduce the number of bacteria and increase the survival of septic animals by modulating the immune response.

Keywords: *Escherichia coli*, Pic, sepsis, propolis, EPP-AF®

LISTA DE ABREVIações

ANOVA	Análise de Variância
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina triptofato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUMA	Centro Universitário do Maranhão
CLP	Ligadura e perfuração cecal
DAEC	<i>E. coli</i> de adesão difusa
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIs	Infecções extra intestinais
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EPP-AF®	Extrato padronizado de própolis Apis Flora®
EEP	Extrato etanólico de própolis
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extra intestinal
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo

MBC	Concentração bactericida mínima
MC	MacConkey
MIC	Concentração inibitória mínima
MCP	Proteína quimiotática de macrófagos
MDSC	Células supressoras derivadas da linhagem mielóide
MH	Mueller-Hinton
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NO	Óxido Nítrico
DO	Densidade óptica
PAIs	Ilhas associadas à patogenicidade
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato
Pic	Proteína envolvida na colonização
PMN	Polimorfonuclear
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PSGL-1	Ligante 1 da glicoproteína P-selectina
P200	animais tratados com 200 mg/kg de EPP-AF®
P400	animais tratados com 400 mg/kg de EPP-AF®
qSOFA	<i>Quick Sequential Organ Failure Score</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SP	São Paulo
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga
SUS	Sistema Único de Saúde

TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	T reguladoras
TSB	Caldo de soja tripticase
UFC	Unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UTI	Unidade de terapia intensiva

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Escores da Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos (SOFA) _____ 22
- Tabela 2.** Análise histológica do fígado, rim e pulmão dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____ 40
- Tabela 3.** Contagem de hemácias, plaquetas e proteínas plasmáticas dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____ 42
- Tabela 4.** Razões entre leucócitos e entre plaquetas/linfócitos dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____ 44
- Tabela 5.** Contagem de células do baço, da medula óssea e do lavado peritoneal dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____ 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resposta imune após infecção _____	20
Figura 2. Origem da própolis verde brasileira _____	26
Figura 3. Desenho experimental da análise de sobrevida dos animais submetidos à sepse por inoculação intraperitoneal de <i>E. coli</i> F5 e tratados de forma profilática e terapêutica _____	32
Figura 4. Animais submetidos à sepse por inoculação intraperitoneal de <i>E. coli</i> F5 e tratados de forma profilática _____	34
Figura 5. Curva de morte resultante da ação do EPP-AF® frente a <i>E. coli</i> F5 _____	37
Figura 6. Curva de morte resultante do EPP-AF® (20 mg/mL) frente a <i>E. coli</i> F5 _____	38
Figura 7. Curva de sobrevida dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____	38
Figura 8. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) das amostras de sangue, lavado peritoneal e órgãos dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____	39
Figura 9. Análise histológica dos órgãos dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____	41
Figura 10. Contagem total e diferencial dos leucócitos do sangue dos animais submetidos à sepse e tratados com EPP-AF® _____	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEORICO	14
2.1	<i>Escherichia coli</i>	14
2.2	Proteína envolvida na colonização intestinal (Pic).....	15
2.3	Sepse.....	18
2.3.1	Definição e Epidemiologia	18
2.3.2	Resposta imune regulada x resposta imune exacerbada.....	19
2.3.3	Diagnóstico e tratamento da sepse.....	21
2.4	Produtos naturais como alternativa terapêutica no tratamento a sepse	23
2.5	Própolis.....	24
2.5.1	Origem e composição.....	24
2.5.2	Tipos de própolis	25
2.5.3	Propriedades biológicas da própolis	26
2.5.4	Extrato de própolis padronizado (EPP-AF®).....	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	Geral.....	29
3.2	Específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Amostra bacteriana	30
4.2	Extrato padronizado de própolis (EPP-AF®)	30
4.3	Ensaio <i>in vitro</i>	30
4.3.1	Ensaio de macrodiluição caldo	30
4.3.2	Ensaio da curva de morte (<i>time-kill curve</i>)	31
4.4	Ensaio <i>in vivo</i> de sepse induzida por inoculação intraperitoneal de bactérias	31
4.4.1	Animais e indução da sepse	31
4.4.2	Avaliação da sobrevivência dos animais	32
4.4.3	Indução da sepse, tratamento e eutanásia dos animais	33
4.4.4	Coleta do sangue e obtenção das células do peritônio, baço e medula	34
4.4.5	Peso dos órgãos e Avaliação Histopatológica	35
4.4.6	Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....	35

4.5	Análise Estatística.....	35
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54