



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS NA
SEPSE EXPERIMENTAL**

ALUÍZIO CARLOS SOARES

BRASÍLIA-DF
2014

ALUÍZIO CARLOS SOARES

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS NA
SEPSE EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas em Saúde.

Orientadora: **Profa Dra Vania Maria Moraes Ferreira**

BRASÍLIA-DF

2014

ALÚZIO CARLOS SOARES

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS NA
SEPSE EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas em Saúde.

Aprovada em 07 de Março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vania Moraes Ferreira
(Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Vaneila Ferreira Martins
(Membro titular externo)
Universidade Federal do Goiás

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
(Membro titular interno)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Mônica Valero da Silva
(Membro suplente)
Universidade de Brasília

BRASÍLIA-DF

2014

*Dedico esta Dissertação de Mestrado
a minha esposa e filhos, as maiores
motivações e estímulo de meu
crescimento pessoal e profissional.
Amo vocês!!!!*

AGRADECIMENTOS

- A minha Orientadora Profa. Dra Vania Ferreira pela paciência e por toda a ajuda ao longo desses meses de orientação e pesquisa.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e aos professores que fazem parte do seu corpo docente, por enriquecer nossos conhecimentos.
- Ao Centro de Patologia Clínica, do Hospital Universitário de Brasília, com destaque à minha chefe Ana Beatriz, por entender a importância desta formação profissional, nos dando oportunidade da realização deste Mestrado.
- A todos os colegas do Centro de Patologia Clínica, em especial a Aninha, Torlane e Branca, por compartilharem a alegria dessa formação.
- Aos parceiros diários de convívio pessoal e/ou profissional, Fabiano, João Eudes e Melissa por compartilharem comigo as “angústias” e anseios na busca de novos ideais, visando um futuro melhor.
- Ao Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, por sempre estimular a realização de pesquisas que possam, de alguma forma, contribuir com a ciência, na descoberta de novos alvos de ação para a profilaxia, tratamento ou cura das doenças.
- Ao Biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás-GO), pelo fornecimento de animais experimentais que sem eles, com certeza, este trabalho estaria totalmente inviabilizado.
- Ao Sr. Dedé, técnico da Faculdade de Saúde, da Universidade de Brasília, pelos cuidados diários com os animais experimentais, priorizando os princípios éticos exigidos pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA).

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."¹ "Nossa maior fraqueza está em desistir. A maneira mais segura de se ter sucesso é sempre tentar mais uma vez."²

¹ José Alencar & ² Thomas Edison

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desregulação da homeostasia celular decorrente da resposta inflamatória sistêmica.	18
Figura 2 – Processo de preparo do extrato de própolis.	29
Figura 3 – Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLPC).	30
Figura 4 – Teste do Campo aberto.	31
Figura 5 – Teste do Labirinto em cruz elevado.	33
Figura 6 – Teste do Nado forçado.	34
Figura 7 – Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	35
Figura 8 – Delineamento experimental.	37
Figura 9 – Atividade locomotora de ratos administrados com o extrato de própolis ou antibióticos avaliados no Teste do Campo aberto.	39
Figura 10 – Avaliação do comportamento relacionado à ansiedade de ratos machos administrados com extratos de própolis ou antibióticos, e avaliados no Teste do Labirinto em cruz elevado.	40
Figura 11 – Efeito do extrato de própolis ou antibióticos em ratos avaliados no teste do Nado Forçado.	41
Figura 12 – Efeito do extrato de própolis ou antibióticos em ratos avaliados no teste da Esquiva Inibitória.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
AMPc.....	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA.....	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CLPC.....	Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal
EBA	Entradas nos braços abertos
EBF	Entradas nos braços fechados
G-CSF	Fatores de crescimento
HPLC.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
i.p.	Via intraperitoneal
IL	Interleucinas
LCE	Labirinto em cruz elevado
LPS	Lipopolissacarídeos
MAO	Monoamino-oxidase
MCD	Memória de Curta Duração
MLD.....	Memória de Longa Duração
OF	Operação Fictícia
OMS	Organização Mundial de Saúde
s.c.....	Via subcutânea
SIRS.....	Síndrome inflamatória de resposta sistêmica
SNC.....	Sistema Nervoso Central
TAG.....	Transtorno de ansiedade generalizada
TBA	Tempo nos braços abertos
TBF	Tempo nos braços fechados
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
v.o.	Via oral

RESUMO

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica e é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em Unidade de Terapia Intensiva. Nos últimos anos, ainda que com muitas descobertas no campo da antibioticoterapia, somente alguns poucos benefícios foram observados em pacientes sépticos. A flora brasileira é um dos maiores investimentos de companhias farmacêuticas em busca de terapias alternativas. A própolis, por exemplo, é uma dessas terapias devido as suas propriedades antimicrobianas. Visto que nosso país é rico nesta fonte natural, este estudo foi conduzido para avaliar os efeitos do extrato de própolis verde nas alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da infecção sistêmica. Com o objetivo de avaliar esta proposta, foram usados 40 ratos Wistar machos, com 2,5 meses de idade, anestesiados com ketamina e xilazina antes dos procedimentos cirúrgicos. Os animais controles (operação fictícia – OF) não receberam perfuração e nem ligadura. Metade dos animais foram administrados com os antibióticos clindamicina (25 mg/kg, i.p.) + gentamicina (3 mg/kg, i.p.) antes dos procedimentos cirúrgicos, e novamente com 24 e 48 horas. O extrato de própolis (100 mg/kg, i.p.) foi administrado no mesmo regime de tratamento dos antibióticos. As avaliações comportamentais e cognitivas foram avaliadas com 48 e 72h. Para tal, eles foram divididos em 4 grupos: 1) OF+antibióticos, 2) OF+própolis, 3) Sepse+antibióticos, e 4) Sepse+própolis, para serem avaliados no teste do campo aberto (locomoção), labirinto em cruz elevado (ansiedade), nado forçado (depressão/estresse), e esQUIVA inibitória (memória). Foi observado que os animais que sobreviveram à sepse tratados com antibióticos diminuíram o percentual de entradas nos braços abertos e tempo de permanência nesses braços do LCE, resposta sugestiva de aumento de níveis de ansiedade. Nesses mesmos animais, não foi observada qualquer alteração na locomoção, enquanto que no teste do nado forçado eles reduziram o tempo de imobilidade, sugerindo comportamento de estresse resultante da reação de fuga/luta. Além disso, foi observado também prejuízo na memória de curta e longa duração, que foi revertido pelo extrato de própolis, mantendo uma resposta similar aos animais controles OF. Em um contexto geral, o extrato de própolis pode prevenir as alterações comportamentais e cognitivas resultantes da sepse experimental, cabendo investigar os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos com as respostas dessa terapia natural.

Palavras-chave: Ansiedade, Depressão, Memória, Própolis, Sepse.

ABSTRACT

Sepsis is a systemic inflammatory response and it is on the major cause of morbidity and mortality in the intensive care unit. In recent years, even with many discoveries in the field of antibiotic therapy, only a few clinical benefits were observed in septic patients. The Brazilian flora is one of the biggest investments of pharmaceutical companies seeking alternative therapies. Propolis, for example, is one of these therapies because has antimicrobial properties. Given that our country is rich in these natural resources, this study sought to evaluate the effects of green propolis in behavioral and cognitive impairments resulting from systemic infection. In order to evaluate this proposal, it was used 40 Wistar male rats, 2.5 months old, anesthetized with ketamine + xylazine before the surgical procedure. The control animals (sham) did not receive neither ligation and perforation. Half of the animals were administered with the antibiotics clindamicine (25 mg/kg, i.p.) + gentamicin (3 mg/kg, i.p.) before surgery procedures, and again 24h and 48h latter. Propolis extract (100 mg/kg, i.p.) was administered in the same treatment regimen of the antibiotics. The behavioral and cognitive assessments were evaluated with 48h or 72h latter. They were divided into 4 groups: 1) Sham+antibiotics, 2) Sham+propolis, 3) Sepsis+antibiotics, and 4) Sepsis+propolis, which were evaluated in the open field (locomotion), elevated plus maze-EPM (anxiety), forced swimming (depression) and step down inhibitory avoidance (memory) tests. It was observed that the animals subjected to systemic infection decreased the percentage of open arms entries and open arms time of the EPM, suggestive of anxiety-like behavior. No changes were observed in locomotion, whereas in the forced swimming test animals that survived the infection showed a reduced immobility time, suggesting stress-like behavior resulted from the reaction of flight/fight. Systemic infection survivor rats showed impairment in short and long term memories, which was blocked by propolis extract with a similar response of the sham surgery. In overall, propolis extract can prevent behavioral and cognitive changes resulting from experimental sepsis, leaving to investigate the cellular and molecular mechanisms involved in these natural therapy responses.

Keywords: Anxiety, Depression, Memory, Propolis, Sepsis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Sepse: características gerais e tratamentos.....	16
1.2 Medicina natural e o potencial terapêutico da própolis.....	20
1.3 Comportamento e cognição: características gerais.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Animais.....	28
3.2 Drogas e soluções.....	28
3.3 Preparação do extrato de própolis	29
3.4 Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal	30
3.5 Modelos experimentais.....	31
3.5.1 Teste do Campo aberto	31
3.5.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	32
3.5.3 Teste do Nado forçado	34
3.5.4 Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	35
3.5.5 Delineamento experimental	37
3.6 Análise estatística	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Teste do Campo aberto.....	39
4.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	39
4.3 Teste do Nado forçado.....	41
4.4 Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	42
5 DISCUSSÃO	43

6 CONCLUSÕES	49
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	69
Comprovante do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)	70

1 INTRODUÇÃO

A palavra própolis é derivada do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade, isto é, “em defesa da comunidade ou da colméia” (LUSTOSA et al., 2008; WAGH et al., 2013). É uma substância lipofílica, de consistência dura e quebradiça, no entanto, quando aquecida, torna-se macia, maleável e pegajosa (HAUSEN et al., 1987). Possui um cheiro aromático característico agradável que, dependendo da origem, pode variar a sua cor em verde, vermelho, amarelo, marrom escuro e, até mesmo, transparente (BANKOVA et al., 2000; MARCUCCI, 1995).

O primeiro trabalho científico com própolis foi publicado em 1908 (HELFENBERG, 1908), sendo que desde meados de 1970, vários estudos têm investigado a sua composição por meio de diferentes meios analíticos, sendo que os mais utilizados são a espectrofotometria de massa por cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance/Pressure Liquide Chromatography*) (CHANYCHEV e KUDASHEV, 1976) .

Por meio dessas técnicas, complementadas por outros meios de investigações, observou-se que o extrato de própolis contém cerca de 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos etéreos, 5% de pólen, vitaminas (B1, B2, B6, C e E), elementos minerais (Ca, Cu, I, K, Mg, Na, Zn, Mn e Fe), e enzimas, tais como succínico desidrogenase, trifosfatase de adenosina, glicose-6-fosfatase e da fosfatase ácida (NIKOLAEV, 1978). Além disso, ele pode também ser constituído por uma série de ácidos graxos, aminoácidos, terpenos, flavonóides e os derivados do ácido cinâmico (BANKOVA, 2005; KHAYYAL et al., 1993; MOREIRA, 1986).

Com base nessas informações, nos últimos anos observou-se que existe uma grande variação na composição química da própolis e ela está diretamente relacionada aos tipos e origens de suas plantas e região geográfica (POPOVA et al., 2012a). No entanto, para garantir a riqueza da avaliação química de cada espécie, muitos de seus compostos ativos foram avaliados em grupos e não de forma individualizada por procedimentos espectrofotométricos, sendo estes uma abordagem eficaz para o desenvolvimento de padrões de qualidade do referido

produto. Em estudos realizados por vários pesquisadores chamou-se a atenção para o fato de o conteúdo fenólico ter sido o que apresentou maior atividade antimicrobiana da própolis (POPOVA et al., 2012b).

Considerando essas descobertas, esse fitoterápico se tornou alvo de interesse de nosso grupo de pesquisa nos processos infecciosos sistêmicos. A sepse, portanto, sendo um exemplo desse tipo de síndrome sistêmica, serviu de modelo para nossa investigação, visto que é bastante complexa e se apresenta dentre as maiores causas de morbidade e mortalidade entre pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), tendo aumentado a sua frequência de ocorrência de forma significativa nos últimos anos (KARNATOVSKAIA e FESTIC, 2012; MAYR et al., 2014).

Cabe destacar que dentre as principais sequelas decorrentes da sepse são as relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC), onde o problema mais crítico parece envolver a encefalopatia séptica, que está diretamente associada às alterações nas funções cerebrais afetadas pela presença de microorganismos ou suas toxinas no sangue (ZIAJA, 2013). No curso da bacteremia séptica, pode-se observar alterações dos estados mentais, traduzidas por prejuízo da atenção, orientação, concentração e escrita, chegando até mesmo a casos em que se observou delírio e coma (PAPADOPOULOS, 2000).

Dada a gravidade dessas manifestações neurológicas, o controle da resposta inflamatória no quadro séptico se faz necessário. Para tal, muitos são os estudos que buscam usar novos agentes terapêuticos anti-inflamatórios para impedir as suas sequelas (MATSUDA et al., 2012). No entanto, como um dos maiores problemas decorrentes das terapias que existem no mercado farmacêutico está relacionado aos eventos adversos, terapias naturais podem, provavelmente, constituir um novo alvo de investimento para reduzir os eventos adversos. O uso da própolis pode, talvez, se constituir em uma boa terapia natural a ser pesquisada.

Assim, levando-se em consideração o potencial anti-inflamatório e protetor do extrato de própolis verde, essa pesquisa procurou avaliar os seus efeitos na sepse induzida experimentalmente em ratos.

1.1 Sepses: características gerais e tratamento

A sepsis é uma síndrome inflamatória sistêmica devido a uma infecção microbiana, onde as infecções gram-positivas são responsáveis pela metade dos casos diagnosticados, apesar das gram-positivas, anaeróbicas e fúngicas também serem fontes potenciais de danos para o funcionamento de vários órgãos (MARTIN et al., 2003).

Nos Estados Unidos da América (EUA) a sepsis está associada com um número estimado de 750.000 internações, 570.000 visitas ao departamento de emergência e 200.000 mortes, gerando gastos de aproximadamente 16,7 bilhões dólares ao ano (MITCHELL et al., 2014). Em todo o mundo, uma proporção crescente de mortalidade (aproximadamente mais de 40%) em âmbitos de cuidados intensivos públicos tem recebido uma maior atenção, isto porque suas causas alarmantes de óbitos incluem fatores relacionados desde as complicações que podem aparecer no nascimento (mortalidade neonatal) até os casos que comumente aparecem em adultos, superando o infarto agudo do miocárdio e as neoplasias malignas (MWANIKI et al., 2012).

Na América Latina, incluindo o Brasil, estes dados ainda são pouco divulgados visto que, em geral, os registros normalmente enfatizam o diagnóstico mas não identificam os pacientes que desenvolveram sepsis durante o tempo em que estiveram na UTI. Além disso, por razões econômicas, na maioria das vezes, não há dados epidemiológicos consistentes que permitam uma investigação adequada, preventiva ou, até mesmo, estratégias para reduzir este problema de saúde (CONDE et al., 2013; SILVA et al., 2004).

Dos poucos registros encontrados na literatura, chama-se a atenção para um estudo multicêntrico realizado em hospitais públicos e privados, em diferentes regiões do Brasil, onde foram consideradas diversas variáveis relacionadas aos quadros de infecções sistêmicas. Observou-se uma incidência desse diagnóstico em 57 em cada 1.000 pacientes/dia hospitalizados em UTI, com uma taxa de mortalidade de 21,8% (SILVA et al., 2004). Trabalho mais recente mostrou que esta taxa de mortalidade predomina mais em hospitais públicos, em decorrência

da demora no diagnóstico da sepse e tratamentos inadequados, situação contrária aquela observada em hospitais particulares (CONDE et al., 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), considerando uma média de 130 milhões de recém-nascidos, cerca de quatro milhões morrem anualmente, sendo a infecção a causa de 36% desses óbitos. Este problema torna-se mais crítico nos países onde a disponibilidade de recursos para o paciente crítico é limitada. Dados alarmantes também aparecem nas internações de pacientes jovens a adultos. Soma-se a estes fatos, um sistema público de saúde ainda em desenvolvimento que apresenta diferenças, não só em relação a criança mas também ao adulto (HENTGES et al., 2014).

Apesar da resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por taquicardia, taquipnéia, hipertermia e leucocitose, ser mais frequentemente associada à presença de infecção, há diversos promotores da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) nos diversos períodos da internação, desde o momento de entrada tais como: no parto traumático, asfixia perinatal grave, erros inatos do metabolismo e aos procedimentos cirúrgicos de faixas etárias maiores. Estas e outras condições são responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios, que ativarão a cascata de eventos pró-inflamatórios, podendo culminar no choque séptico (FERREIRA et al., 2014).

As disfunções orgânicas decorrentes da sepse se dão devido, principalmente, a resposta do hospedeiro aos microorganismos invasores. Embora a resposta imune inata seja importante para conter infecções, a sua desregulação pode conduzir a resultados bastante preocupantes (WANG et al., 2014). Por ser uma resposta inflamatória, ela é marcada por uma produção desregulada de citocinas pro-inflamatórias, que levam a falência múltipla dos órgãos e, posteriormente, à morte (HUTCHINS et al., 2014).

As citocinas desempenham um importante papel nas respostas imunes e inflamatórias *in vivo*, sendo um grupo de proteínas de baixo peso molecular secretadas por células imunitárias (linfócitos e macrófagos), fibroblastos e células endoteliais. Elas são divididas em dois grupos: linfocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ) secretadas pelas células T com uma função imune; e monoquinas (IL-1, IL-6,

IL-8 e TNF- α) secretadas por macrófagos mononucleares, com atividade inflamatória moderada (FULIANG et al., 2005). Dentre outros mediadores inflamatórios destacam-se a histamina, bradicinina, prostaglandinas, fator de ativação plaquetária, neutrófilos e fator de quimiotaxia celular (AKARASEREENONT et al., 1995). A figura 1 ilustra, de forma resumida, como essas disfunções são desencadeadas.

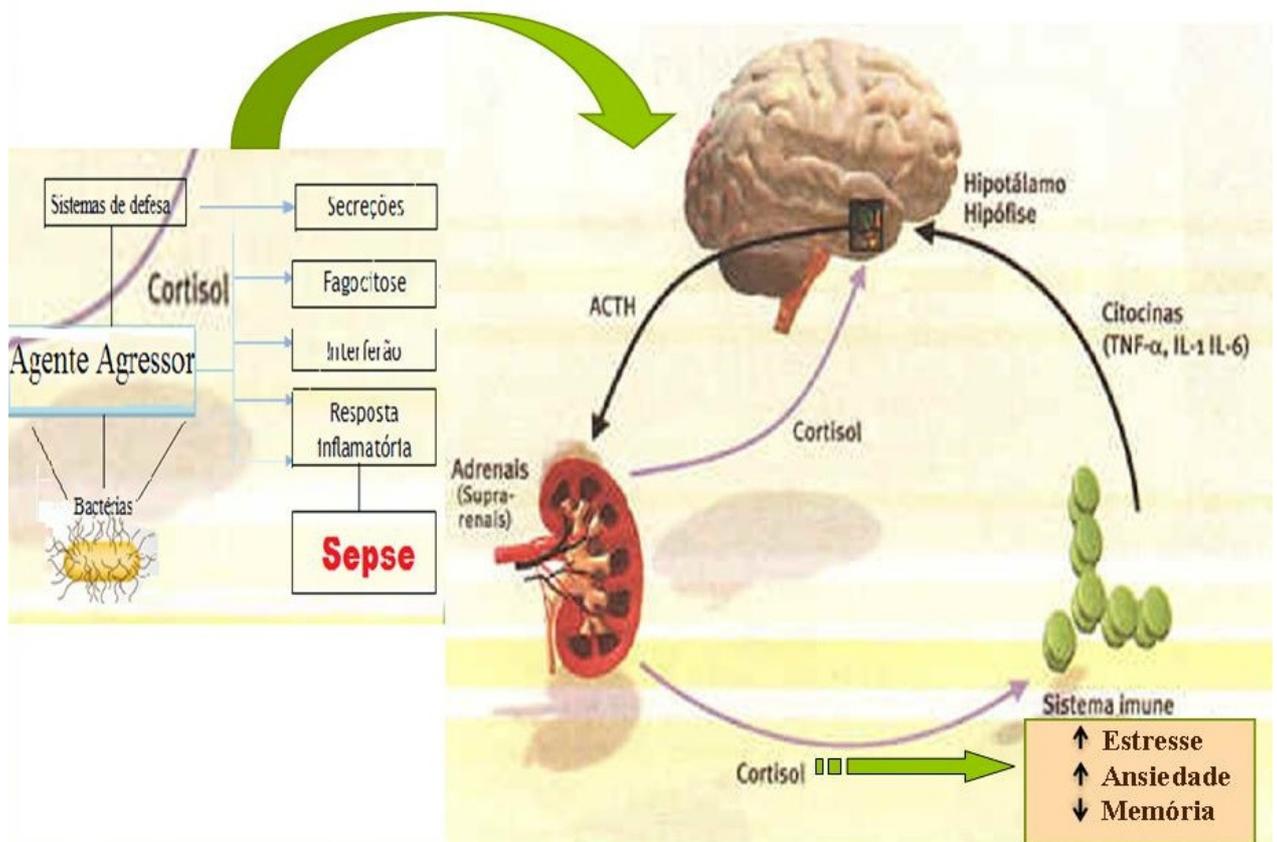


Figura 1- Desregulação da homeostasia celular decorrente da resposta inflamatória sistêmica frente aos agentes agressores, resultando nas liberações dos mediadores inflamatórios e afetando múltiplos órgãos do corpo, tendo como consequência final a sepse (Adaptado de Balk, 2000).

A antibioticoterapia é indispensável para os pacientes sépticos e muitos antibióticos são utilizados para evitar suas consequências tardias. Terapias imunomoduladoras ou que melhoram a função das células imunes são potencialmente promissoras e devem ser investigadas em um ambiente clínico. Tradicionalmente, embora sem sucesso, a maioria daquelas dirigidas para a sepse não atua especificamente na imunossupressão induzida, mas sim foca na fase pró-inflamatória (HUTCHINS et al., 2014; MARSHALL, 2014).

A utilização de antibióticos pela medicina moderna tem aumentado, de forma significativa, em decorrência da inovação tecnológica visando a sobrevida dos pacientes. Esse consumo elevado vem da preocupação sobre os impactos econômicos dos gastos públicos frente aos quadros crescentes de doenças infecciosas (AGA et al., 2014).

Embora mesmo diante da grande variedade desses tipos de medicamentos para tratar as infecções microbianas, é importante considerar a frequência e gravidade dos efeitos adversos que podem acompanhá-los. No entanto, como o arsenal de antibióticos disponíveis no mercado vem sendo progressivamente esgotado devido à resistência microbiana, há necessidade de se buscar tratamentos alternativos e menos tóxicos (HUTCHINS et al., 2014).

Atualmente, com base no que foi relatado previamente, as terapias experimentais para a sepse têm sido alvos de pesquisas a fim de entender a fisiopatologia dessa doença, bem como melhorar a sobrevida dos pacientes. Elas têm representado um avanço no tratamento de suporte ao paciente e no desenvolvimento de novas drogas. Apesar disso, os índices de mortalidade por sepse grave ainda são altos (WIERSINGA, 2011).

Considerando a riqueza das propriedades terapêuticas dos produtos naturais, é provável que os componentes ativos do extrato de própolis, por exemplo, possam se constituir em um investimento das indústrias farmacêuticas para tratar as complicações clínicas decorrentes da sepse, em contraposição com as terapias pró-inflamatórias, encorajando-nos a aplicação de citocinas e moléculas antagonistas co-inibitórias para melhorar as respostas imunes em pacientes criticamente enfermos. Coube aqui nosso interesse nessas investigações, com enfoque voltado para o SNC.

1.2 Medicina natural e o potencial terapêutico da própolis

O Brasil é rico em diversidade cultural e é habitado por vários tipos de comunidades tradicionais e grupos étnicos, tais como os indígenas. Esta miscigenação reforça a cultura e rituais de algumas comunidades brasileiras e etnias, enriquecendo-os do ponto de vista etnobotânico (GIOGERTTI et al., 2007). Pouco se sabia sobre o Brasil na época do descobrimento. Os primeiros jesuítas, exploradores e colonizadores a chegarem em nosso país foram os pioneiros nos registros etnobotânicos em plantas medicinais brasileiras e seus usos por diferentes populações (GIOGERTTI et al., 2007; KURY, 2001).

Com o tempo, esses conhecimentos tomaram caminhos diferentes, sendo transmitidos entre as diversas culturas. Dessa forma, as informações foram difundidas e amplamente divulgadas para várias populações em todas as partes do mundo. No entanto, apenas alguns registros sobreviveram em livros dos séculos passados (FABRE, 2003, HEINRICH et al., 2006; KUFER et al., 2005).

Atualmente, é possível observar na literatura científica a aplicabilidade terapêutica de vários produtos advindos da natureza como, por exemplo, a *Pouteria ramiflora*, conhecida como “curiola”, que é um exemplo de medicina natural com propriedades antinociceptivas e antiinflamatórias (FONTES-JR et al., 2009). A *Cipura paludosa*, um membro da família Iridaceae, conhecida como “cebolinha-do-campo” ou “batata-roxa”, também vem chamando atenção por seus efeitos antiinflamatórios (LUCENA et al., 2007a) e neuroprotetores (LUCENA et al., 2007b). Por fim, no que se refere aos déficits comportamentais e/ou cognitivos, o extrato de *Melissa officinalis*, chamada popularmente de “erva cidreira” (TAIWO et al., 2012), e o extrato de *Cipura paludosa* (LUCENA et al., 2010, 2013) também se destacaram por essas ações farmacológicas.

Considerando essas informações, observa-se que a natureza tenta auxiliar no tratamento de doenças fornecendo diversos componentes químicos ativos úteis também contra infecções causadas por bactérias, vírus e fungos, ao mesmo tempo em que oferece suporte terapêutico para múltiplos órgãos e sistemas do corpo (MCKENZIE, 2011; SCAGLIONE et al., 2010; TEXTORIS et al., 2011).

No Brasil, como em outras partes do mundo, os efeitos biológicos da própolis, por exemplo, têm sido difundidos pela medicina popular ao longo do tempo (ANAUATE NETTO et al., 2013; BURDOCK, 1998). Ela é amplamente utilizada em cosmetologia, indústria alimentícia, de bebidas e suplementos alimentares (MEDIC-SARIC et al., 2009; SFORCIN e BAKOVA, 2011). No Japão, a própolis brasileira é consumida em alimentos e bebidas com a finalidade de melhorar a saúde humana (BANKOVA et al., 1996; KISORE et al., 1994).

Esta resina vem atraindo a atenção de cientistas pela sua composição química e seu potencial terapêutico para o desenvolvimento de novas drogas (SFORCIN e BANKOVA, 2011). Seus compostos ativos justificam suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória e cicatrizante (CHAN et al., 2013; FAROOQUI e FAROOQUI, 2012; HU et al., 2005; KHALIL, 2006; MARCUCCI, 1995). O seu óleo essencial também contém terpenóides, compostos aromáticos e alifáticos que apresentam atividade antibacteriana (GAREDEW et al., 2004; MELLIYOU et al., 2007) e inibe a peroxidação de lipídios (ANTUGULU et al., 2007, 2008).

Muitas das evidências científicas têm atribuído essas propriedades a alguns flavonóides e compostos fenólicos. A própolis brasileira apresenta uma família rica em produtos fenólicos e prenilados (MARCUCI e BANKOVA, 2000). Os compostos fenólicos são encontrados em níveis elevados em várias amostras desse produto e têm sido considerados os principais constituintes das atividades imunomoduladoras (DE FUNARI et al., 2007; GALAL et al., 2008). Além disso, eles também apresentaram elevada absorção pela pele humana como um resultado da sua capacidade de formar complexos com as proteínas, por meio de pontes de hidrogênios (DE FUNARI et al., 2007).

De acordo com Kathleen et al. (2013) a própolis pode inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), quimiocinas (MIP-1 α e MCP-1) induzidas por lipopolissacarídeos (LPS), e fatores de crescimento (G-CSF) a partir de macrófagos, bem como a partir de osteoclastos, IL-6 (citocina), MIP-1 α , MCP-1 e IP-10 (quimiocinas). Enquanto as IL-1 α , IL-12 e IL-15 dão suporte a sobrevivência, a ativação e proliferação de células imunitárias adaptativas (células

T e células B) e G-CSF suportam a diferenciação e a proliferação de populações de células imunitárias inatas (neutrófilos e macrófagos). A inibição destas citocinas proporcionou efeitos terapêuticos potentes no tratamento de várias doenças inflamatórias (BRAUN e SCHETT, 2012; SCHETT, 2011).

Quanto à ação imunomoduladora da própolis verde do Brasil, a administração de 200 mg/kg do seu extrato etanólico a ratos, durante 3 dias, melhoraram a imunidade inata, ativando os passos iniciais da resposta imune por regulação da expressão dos receptores “toll-like” TLR-2 e TLR-4 e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) por macrófagos e células do baço, que contribui para o reconhecimento do microrganismo e para ativação dos linfócitos por células apresentadoras de antígenos (ORSATTI et al., 2010a). A própolis verde brasileira, também nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, aumentou a geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), causando a morte de microorganismos (ORSI et al., 2000).

Esses compostos atuam por mecanismos antioxidantes, incluindo a inibição das enzimas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio (xantina-oxidase, proteína quinase C, lipoxigenase, ciclo-oxigenase, oxidação de NADH) ou na quelação dos oligoelementos (ferro livre ou cobre), que são potenciais intensificadores da geração de radicais livres ou estabilizantes desses radicais envolvidos em processos oxidativos por complexação com eles (DALEPRANE, 2013; MIDDLETON et al., 2000; PIETTA, 2000).

Apesar da própolis, sob a forma de extrato etanólico, ser utilizada normalmente para as preparações farmacêuticas comerciais, as frações solúveis em água e as formas de própolis naturais podem ser aplicadas tanto por via oral quanto parenteral, tendo uma boa absorção. Esta característica farmacocinética constitui aspecto positivo relevante para a sua eficácia (KOENIG e DUSTMANN, 1986; MANOLOVA et al., 1987; MAXIMOVA et al., 1985).

Considerando que a própolis apresenta muitos compostos ativos que já foram investigados em vários distúrbios orgânicos, poucos são os relatos que enfocam as suas respostas biológicas *in vivo* no SNC. As suas ações em nível central podem, provavelmente, se constituir em alvos terapêuticos para várias desordens psicológicas e psiquiátricas.

1.3 Comportamento e cognição: características gerais

Nos últimos anos, muita atenção vem sendo dada à área de saúde mental, visto que nas condições de vida que hoje se encontra a população mundial, muitas variáveis aparecem em decorrência de eventos estressores que podem desencadear uma série de doenças (MARTINS et al., 2012). Há de se considerar, ainda na evolução das pesquisas nessa área, que as infecções podem também ser um desencadeador de uma diversidade de processos psicopatológicos como, por exemplo, a ansiedade, depressão e falhas de memória, apesar de muitas lacunas ainda existirem sobre essa abordagem (SUvisaari e Mantere, 2013; York et al., 2012).

Considerando a ansiedade, esta é considerada um problema de saúde pública mundial, sendo que o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico são as duas classificações primárias de ansiedade patológica em humanos. A prevalência de TAG na população em geral, quando associada a desafios potencialmente estressantes, é de cerca de 2 a 5%, com especial prevalência em certas populações, tais como idosos e adolescentes (Stein, 2004).

A depressão, por sua vez, chama atenção pelo fato de que dentre os países em desenvolvimento, o Brasil lidera o *ranking* mundial de prevalência dessa doença, com 18% da população sendo diagnosticada em estado deprimido por pelo menos um ano. O episódio depressivo é uma preocupação significativa para a saúde pública em todas as regiões do mundo, por ser um distúrbio sério e recorrente, ligado a morbidades médicas, à mortalidade e à diminuição da qualidade de vida. A OMS projeta que, em 2020, a depressão seja a segunda maior causa de incapacitação no mundo (WHO, 2013).

Alguns trabalhos mostram uma relação direta entre as alterações psicocomportamentais e os déficits cognitivos, onde as características individuais são fatores fundamentais no entendimento dessa relação (Navarro-Francês e Arenas, 2014; Thompson et al., 2005). Os declínios cognitivos que acometem a população, por sua vez, vêm sendo pauta de várias pesquisas

científicas avançando em muitas descobertas em busca de melhor qualidade de vida, em especial para pessoas com idades mais avançadas. Dentre alguns dados observados na literatura, cerca de 30-50% da população apresenta problemas cognitivos e estes podem estar relacionados, de alguma forma, com fatores psicocomportamentais (DICKERSON et al., 2004; ZARATE et al., 2000)

Quando leva-se em consideração os aspectos moleculares e/ou neuroimunomoduladores que poderiam estar justificando essas respostas psicocomportamentais e cognitivas, chama-se atenção para uma desregulação no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (KALLEN et al., 2008; VERMA et al., 2010). Em situação de níveis significantes de estresse e ansiedade, o hipotálamo secreta hormônio liberador de corticotropina, que estimula a hipófise a secretar hormônio adenocorticotrófico (ACTH). Diante da liberação desse hormônio, as glândulas supra-renais produzem a liberação de cortisol, sendo que as alterações nas suas concentrações podem influenciar, direta ou indiretamente, a imunidade, metabolismo, crescimento, reprodução, depressão, estresse, ansiedade e outros processos fisiológicos importantes (MAGGIO et al., 2013; MONSEY et al., 2014; NATER et al., 2013).

Dentre tantas terapias que poderiam interferir nos aspectos previamente abordados e em diferentes alvos moleculares destaca-se aqui, em caráter somente demonstrativo, os inibidores da monoaminoxidase (MAO) que são geralmente utilizados no tratamento de distúrbios depressivos e algumas doenças neurodegenerativas. Yildiz et al. (2013), com o objetivo de investigar a MAO nesses aspectos, mediram o efeito inibidor de vários produtos apiterapeutas, como mel de castanha, pólen e própolis. Observaram que todas as amostras inibiram a MAO, no entanto a própolis foi a mais eficaz, provavelmente por sua capacidade antioxidante decorrente da quantidade fenólica em sua composição.

Estes resultados mostram que os produtos de abelhas são eficazes não somente contra a depressão em humanos, mas também no tratamento de doenças correlacionadas. Cabe aqui nosso interesse em uma maior investigação sobre esses efeitos no SNC.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral: Avaliar os efeitos neuroprotetores *in vivo* do extrato de própolis verde na sepse induzida experimentalmente em ratos.

2.2 Específicos:

- Observar os parâmetros comportamentais relacionados à locomoção, ansiedade e depressão/estresse de ratos que passaram por procedimentos cirúrgicos com e sem indução de sepse experimental;
- Avaliar as alterações cognitivas dos ratos nas mesmas condições experimentais acima;
- Investigar as propriedades do extrato de própolis nas alterações de comportamentos e déficits cognitivos decorrentes dos processos inflamatórios sistêmicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos testes experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (n=40), com 2,5 meses, com uma média de 300 g, provenientes do Biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás-GO) e mantidos durante o período de uma semana para habituação no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina/UnB. Os animais foram alojados em grupos de cinco por caixa, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente, com água e ração *ad libitum*, de acordo com os as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais. O projeto foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, sob protocolo 82561/2011, conforme comprovante anexado na página 70.

3.2 Drogas e soluções

O extrato de própolis, originado da Pharmanectar Ltda (lote CT#0706), foi diluído com solução fisiológica (0,9%) levemente aquecida, sendo administrado na dose de 100 mg/kg/dia, durante 3 dias. O anestésico ketamina (80 mg/kg) e o relaxante muscular xilazina (10 mg/kg), usados para a sedação dos animais, foram provenientes da Syntec, administrados em associação a partir de uma mesma seringa contendo as duas substâncias, sem qualquer diluição prévia. Os antibióticos clindamicina (25 mg/kg) e gentamicina (3 mg/Kg) foram obtidos do Laboratório EMS, sendo diluídos também em solução fisiológica (0,9%) e administrados também durante 3 dias. Todas as substâncias foram dadas por via intraperitoneal (i.p.), sendo que as doses consideradas estão de acordo com pesquisas prévias realizadas por nosso grupo de trabalho (LEITE et al., 2013) e informações literárias provenientes de artigos científicos indexados internacionalmente (BARICHELLO et al., 2005, 2007; COMIM et al., 2011).

3.3 Preparação do extrato de própolis

A própolis foi coletada a partir de uma colmeia próximo a cidade de Caeté-MG, Brasil, sendo congelada, triturada e misturada com uma solução contendo álcool 96GL (Figura 2). Essa mistura foi deixada por 10 dias sob agitação constante de 10 min uma vez ao dia. Após este período, por meio de um extrator (Soxhlet) de compostos de plantas e produtos naturais, ela foi obtida mediante a evaporação do álcool da solução. O extrato seco foi diluído em solução estoque na concentração de 10% p/v, seguida do congelamento da solução. Este produto foi doado gentilmente pelo Prof. Dr. Nivaldo Paulino, do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Biomedicamentos (BIOMED), Programa de Mestrado Profissional em Farmácia e Programa de Mestrado e Doutorado em Biotecnologia e Inovação em Saúde, Universidade Anhanguera de São Paulo - UNIAN, São Paulo, SP, Brasil.

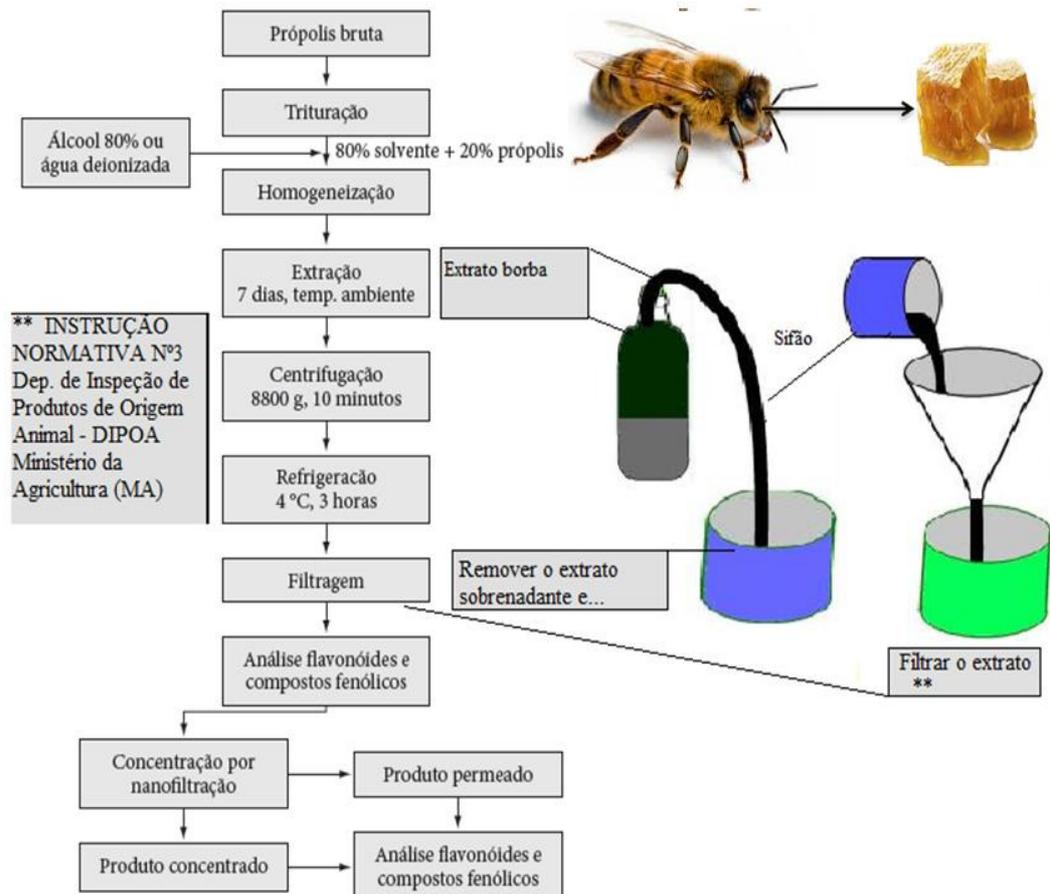


Figura 2 - Processo de preparo do extrato de própolis descrito conforme as etapas: solvente, extração, separação, filtragem e produto final (Instrução Normativa Nº3, sob recomendações do Departamento de Origem Animal- DIPOA, conforme normas do Ministério da Agricultura (Adaptado de APACAME- Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias).

3.4 Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal (CLPC)

Após serem anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.), os animais passaram pelos procedimentos demonstrados na Figura 3. Foi feita a tricotomia na parte ventral dos animais, seguida da incisão central de aproximadamente 2 cm, seguida da exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) no segmento distal próximo da válvula ileocecal. O ceco foi perfurado com agulha 14G na borda antimesentérica. Após a verificação da saída de fezes do ceco, essa estrutura foi retornada à cavidade abdominal. A incisão cirúrgica foi fechada em 2 planos de sutura fásica e músculos abdominais com poliéster 4 (0) em pontos contínuos. No final dos procedimentos, foi administrado um volume de 3 mL de solução salina, via subcutânea (s.c.), como líquido de reanimação. Os animais controles (Operação Fictícia - OF) passaram por todas as etapas cirúrgicas, porém sem perfuração do ceco e ligadura (LEITE et al., 2013).

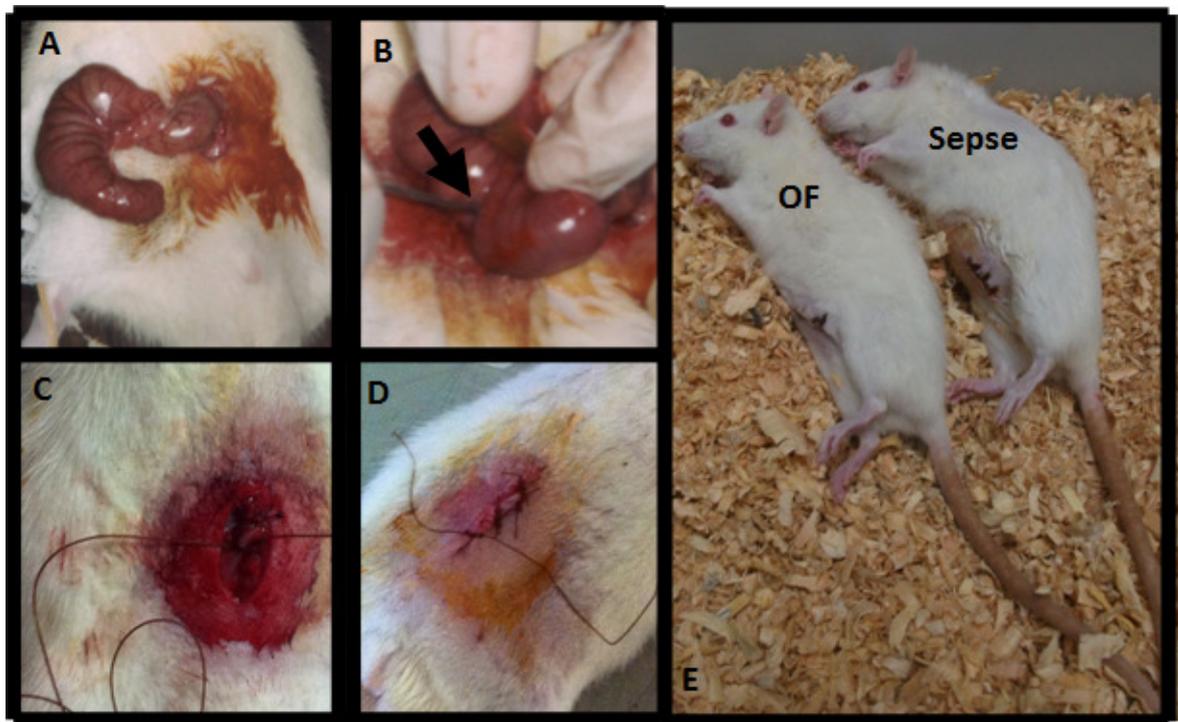


Figura 3 - Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLPC). A= Incisão central no ventre do rato e exposição do ceco, B= A seta representa o local de ligadura com posterior perfuração do ceco e liberação das fezes. C= Inserção do órgão perfurado na cavidade abdominal, seguida de sutura interna e externa, D= Incisão cirúrgica suturada, E= animais em recuperação cirúrgica. OF= Operação fictícia.

Os grupos de animais OF e de sepse foram subdivididos em dois para receberem, por via intraperitoneal (i.p.), antibióticos ou extrato de própolis. As doses dos antibióticos clindamicina (25 mg/kg) e gentamicina (3 mg/Kg) foram dadas antes dos procedimentos cirúrgicos e, novamente, com 24 e 48h. O extrato de própolis (100mg/kg, i.p.) foi administrado no mesmo regime de tratamento dos antibióticos. Os testes experimentais ocorreram 30min após a última administração das substâncias. Para esses experimentos os animais (n=40) foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada (Figura 4):

GRUPO 1: Animais submetidos à OF e tratados com antibióticos.

GRUPO 2: Animais submetidos à OF e tratados com própolis (100 mg/kg).

GRUPO 3: Animais submetidos à Sepse e tratados com antibióticos.

GRUPO 4: Animais submetidos à Sepse e tratados com própolis (100 mg/kg).

3.5 Modelos experimentais

3.5.1 Teste do Campo Aberto

Aparato: Arena em madeira (60x60x35 cm), com o chão dividido em nove quadrantes de 20x20 cm (Figura 5).



Figura 5 – Teste do Campo aberto dividido em 9 quadrantes para avaliar a atividade locomotora dos ratos. Inicialmente, o animal é posicionado no centro da arena para, posteriormente explorar o equipamento durante 5 min.

Fundamento: A avaliação de roedores em uma arena ou campo aberto é um procedimento muito utilizado por vários pesquisadores, com a finalidade de se observar a atividade locomotora de animais de pequeno porte (LUCENA et al., 2010). Em um primeiro momento, sabe-se que ratos, assim como os seres humanos, podem reagir ao ambiente considerado “novo” e apresentar uma resposta aversiva, característica de congelamento (do inglês *freezing*), que é um comportamento típico que, muitas vezes, os animais usam como forma de diminuir as detecções auditivas por parte dos predadores. No entanto, em um segundo momento, ele tende a explorar o ambiente onde se encontra.

Procedimento experimental: Antes do início dos experimentos, os animais foram levados ao laboratório por um período de, no mínimo, uma hora, para aclimação e habituação ao ambiente do teste. A atividade locomotora foi considerada quando o animal atravessava um dos quadrantes do campo aberto com as quatro patas. Cada animal foi testado por um período de 5 min. Todos os experimentos foram conduzidos entre 08:00 e 12:00 h, com o objetivo de evitar a influência de variações circadianas, que poderiam interferir com os resultados experimentais.

3.5.2 Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)

Aparato: Equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x40 cm) e dois abertos (50x10 cm), opostos entre si (PELLOW et al., 1985). Uma proteção de acrílico transparente de 1 cm de altura circundava os braços abertos com o objetivo de impedir a queda dos animais do LCE (Figura 6).

Fundamento: O LCE é baseado na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto. Quando são forçados a permanecerem nesses braços mostram manifestações fisiológicas e comportamentais de medo, tais como congelamento, defecação e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (PELLOW et al., 1985). Como consequência, eles permanecem um tempo maior nos braços fechados.

Estudos de Treit et al., (1993) indicaram que o fator de maior contribuição para esta “reação de medo” era a falta das paredes altas nos braços abertos, que

impedia a tigmotaxia. A proporção da exploração nos braços abertos determinava uma medida de ansiedade, de modo que o aumento nas porcentagens de tempo e de entradas nos braços abertos era considerado indicativo de resposta ansiolítica (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985).



Figura 6 – Teste do Labirinto em cruz elevado utilizado para se avaliar a resposta ansiolítica ou ansiogênica das substâncias administradas nos ratos. O animal é sempre colocado no centro do labirinto para ter a escolha de explorar os braços abertos ou fechados durante um período de 5 min.

Procedimento experimental: Cada rato foi posicionado no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados e colocado para explorar o equipamento por 5 min. O pesquisador fez as anotações do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (EBA e TBA, respectivamente) e o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços fechados (EBF e TBF, respectivamente).

As porcentagens de EBA (%EBA) foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois braços e ao tempo de exploração nesses braços em relação ao tempo total do experimento. Essas porcentagens (%) da EBA e TBA foram calculadas de acordo com as fórmulas: $(EBA/EBA+EBF) \times 100$ e $(TBA/TBA+TBF) \times 100$, respectivamente (LUCENA et al., 2010). O efeito ansiolítico ou ansiogênico foi definido pelo aumento ou diminuição, respectivamente, na proporção das EBA, relativo ao número total de entradas em ambos os braços, e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao tempo total experimental.

3.5.3. Teste do Nado forçado

Aparato: Os animais avaliados no teste do nado forçado (PORSOLT et al., 1977) foram colocados em um cilindro Plexiglass (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), contendo 40 cm de volume de água a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 min (Figura 7).



Figura 7: Aparato utilizado para o Teste do Nado forçado, onde os animais permaneceram dentro por um tempo total de 5 min, onde os 2 primeiros minutos foram considerados para habituação.

Fundamento: Um perfeito modelo experimental para uso com animais deve ser isomórfico às condições humanas e torna-se útil quando pode ser mostrado que tem uma analogia relevante, ou seja, quando ele revela alguns aspectos de um processo complexo, por meio de hipóteses testadas em humanos (MCBRIDE et al., 1998). Existem duas teorias que envolvem o uso desse teste: uma voltada para avaliação de estresse e outra envolvendo o estado de imobilidade dos animais. Neste último caso, alguns autores consideram que este tipo de comportamento pode representar apatia, que é uma característica típica de um estado de depressão. As duas podem ser avaliadas por meio desse modelo, tendo em vista que as reações de fuga e luta são bem caracterizadas (KIRBY e LUCKI, 1998; REDROBE et al., 1998). Este modelo é o mais amplamente utilizado para avaliação farmacológica de atividade antidepressiva (LUCENA et al., 2010).

Procedimentos experimentais: Os ratos exibiram dois tipos de comportamentos em um tempo de 5 min: *fuga*, que foi observada nos primeiros dois minutos; e *imobilidade contínua* nos três últimos minutos (permanecer flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água). Os dois minutos iniciais (*fuga*) foram considerados para habituação ao teste. O tempo da imobilidade foi definido como indicativo de comportamento relacionado à depressão/estresse (KIRBY e LUCKI, 1998; LUCENA et al., 2010).

3.5.4 Esquiva inibitória do tipo *step-down*

Aparato: O aparelho de esquiva (EP-104 INSIGHT) consiste em uma caixa de vidro e metal medindo 50 x 25 x 25 cm, com uma plataforma de 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm comprimento. No canto esquerdo apresenta uma série de barras de alumínio, distribuídas com uma distância de 1 cm entre si, que constitui o assoalho da caixa, conectadas a um estimulador elétrico (Figura 8).

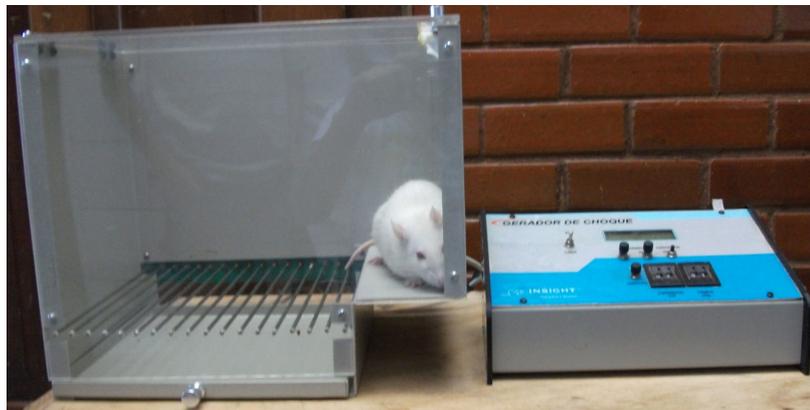


Figura 8 – Esquiva inibitória do tipo *step-down* usada para avaliar a memória de curta e longa duração em rato durante um período de 3 min.

Fundamento: A medida da latência avaliada no teste da esquiva inibitória do tipo *step-down* tem sido um dos modelos experimentais usados por muitos laboratórios na avaliação dos estudos envolvendo aprendizagem e memória (MAIA et al., 2009; LUCENA et al., 2013). Para tal, os parâmetros de avaliação envolvem uma fase de treino e pós-treino e um choque de baixa intensidade, que serve de estímulo aversivo para que o animal deixe de executar uma determinada tarefa que foi a ele apresentada. Esse procedimento deve ser lembrado quando da realização de um teste proposto, como mecanismo de retenção da memória.

Procedimento experimental: As etapas apresentadas a seguir são padronizadas na área de investigação de memória para este teste específico.

- No primeiro dia da análise, os animais foram habituados ao aparato, permanecendo no interior do mesmo por 3 min.
- No segundo dia, os animais foram cuidadosamente colocados na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino, com a face virada para o lado oposto ao do observador. Assim que o animal desceu da plataforma e colocou as quatro patas na grade recebeu um choque de 0,4 mA por 1 seg, sendo retirado imediatamente da caixa de treino. A memória de curta duração (MCD) foi investigada 1 h após o treino. No teste, o tempo (latência) máximo de 3 min (180 seg) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória.
- No terceiro dia (24h após a avaliação da MCD), os animais foram novamente colocados cuidadosamente na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino. A memória de longa duração (MLD) foi avaliada da mesma forma que na MCD, onde o tempo (latência) máximo também de 3 min (180 seg) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória.

Após observar cada animal nos testes, os aparatos foram limpos com álcool 10% (v/v) para evitar que o odor do rato recém-testado interferisse no comportamento dos demais a serem testados.

3.5.5. Delineamento experimental

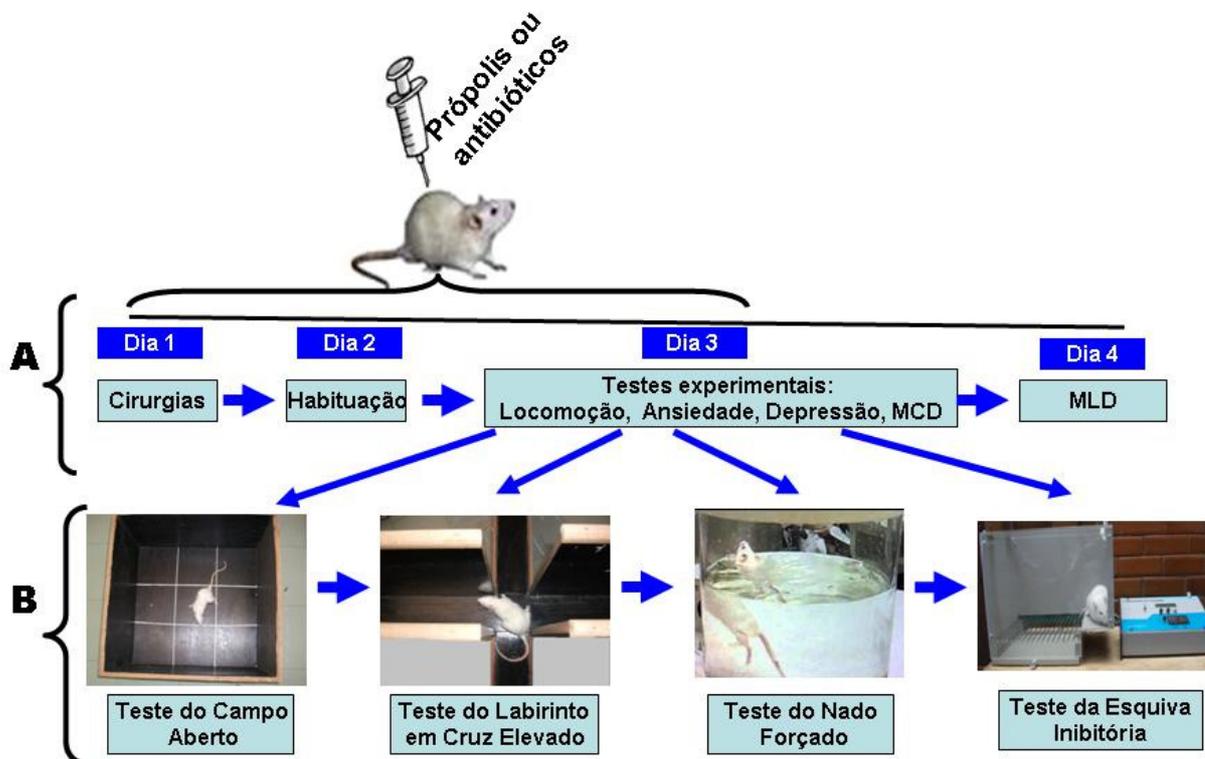


Figura 9 – Delineamento experimental das etapas da administração do extrato de própolis (100 mg/Kg, i.p.): A) Dia 1 - procedimentos cirúrgicos; Dia 2 – habituação dos animais no teste da esquiva inibitória; Dia 3: testes comportamentais (locomoção, ansiedade e depressão/estresse) e avaliação da memória de curta duração – MCD; Dia 4 – avaliação da memória de longa duração (MLD). B) Demonstração dos testes experimentais realizados com os animais sobreviventes aos procedimentos cirúrgicos.

3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 10 animais por grupo. As comparações estatísticas dos resultados comportamentais foram realizadas pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados entre si pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade indicativa da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 5.01®, 2010 (San Diego, CA). Para a avaliação dos dados do tempo de latência no teste de esquiva inibitória do tipo *step-down* foi realizada uma análise não-paramétrica onde foram utilizadas as medianas (com seus intervalos interquartis) e analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do *post hoc* de Dunn.

4 RESULTADOS

4.1 Teste do Campo Aberto

Neste teste, a locomoção dos animais foi avaliada considerando o número total de quadrantes percorridos em um período de 5 minutos. a ANOVA de uma via não revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(3,39)} = 0.3165$, $p=0,8133$], conforme demonstrado na Figura 10.

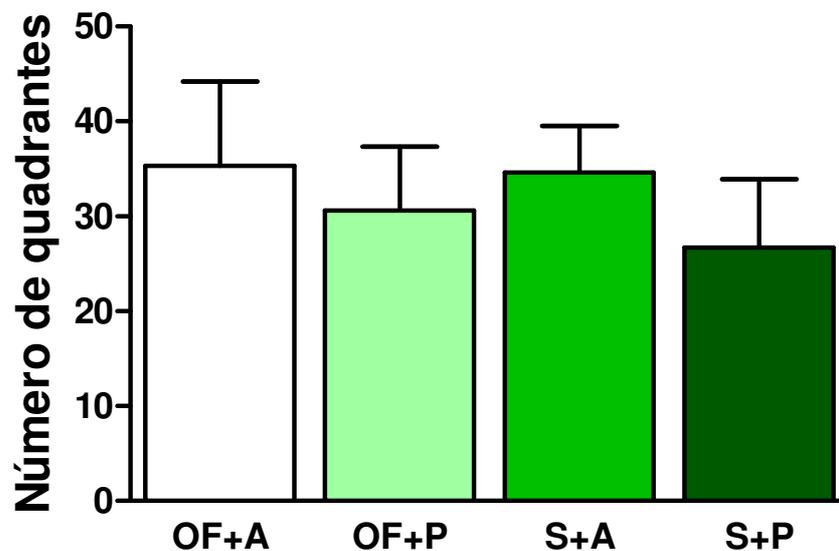


Figura 10 – Atividade locomotora de ratos administrados com o extrato de própolis (100 mg/Kg, i.p.) ou antibióticos e avaliados no teste do campo aberto por 5 min. Os dados representam a média \pm epm de 10 animais/grupo. OF+A= Operação fictícia+Antibióticos, OF+P= Operação fictícia+Própolis, S+A= Sepse+Antibióticos, S+P= Sepse+Própolis.

4.2 Teste do LCE

A investigação dos níveis de ansiedade de ratos que sobreviveram aos procedimentos cirúrgicos foi realizada no teste do LCE após 48h dos procedimentos cirúrgicos (Figura 11). A ANOVA de uma via mostrou que os animais do grupo sepse reduziram a %EBA [$F_{(3,39)} = 10,07$, $p<0,0001$] e a %TBA [$F_{(3,39)} = 6,484$, $p=0,0013$] do LCE. Nenhuma alteração foi observada na frequência de EBF [$F_{(3,39)} = 0,025$, $p=0,8233$]

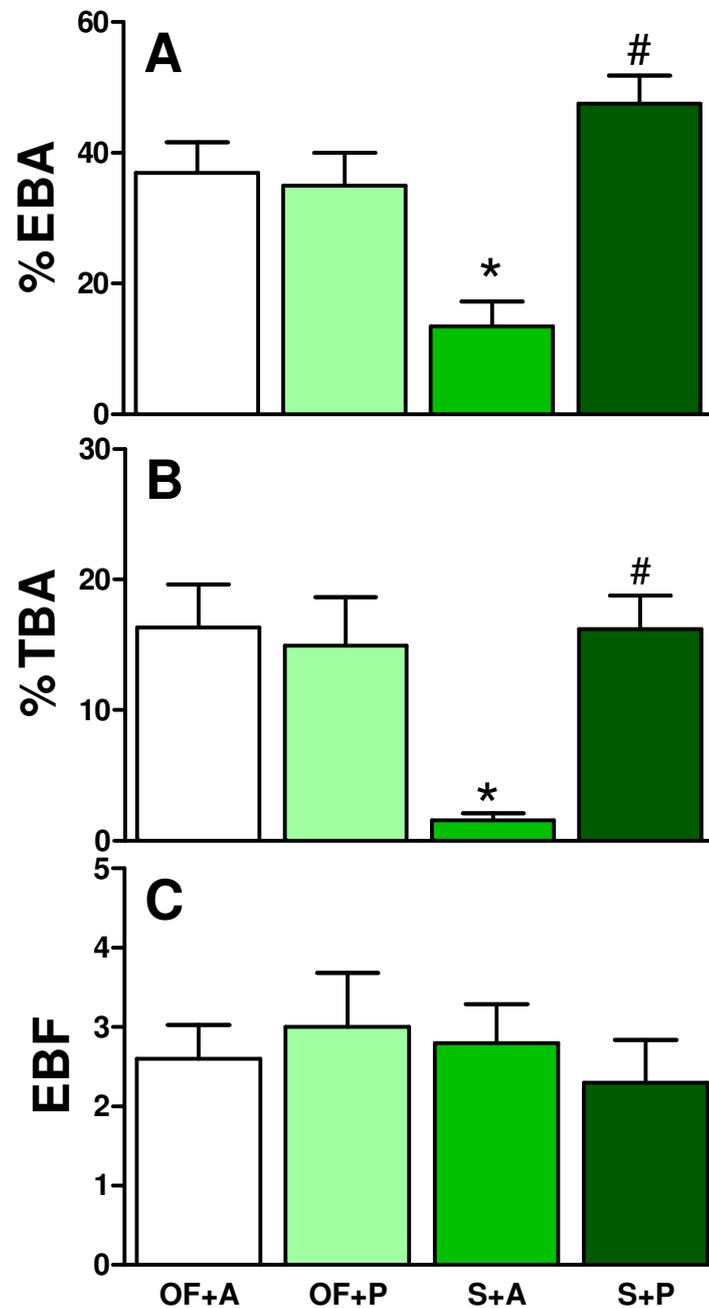


Figura 11 – Avaliação do comportamento relacionado à ansiedade de ratos administrados por via i.p. com extratos de própolis (100mg/kg) ou antibióticos, e avaliados após 48h no teste do LCE. A) %EBA - representa a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE; B) %TBA – representa a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE; C) EBF – representa a frequência de entrada nos braços fechados do LCE. * $p \leq 0,05$ comparado com aos animais do grupo controle OF + antibióticos; # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo de sepse + antibióticos (ANOVA, teste de Newman Keuls). OF+A= Operação fictícia+Antibióticos, OF+P= Operação fictícia+Própolis, S+A= Sepse+Antibióticos, S+P= Sepse+Própolis.

4.3 Teste do Nado Forçado

Para avaliar o comportamento sugestivo de depressão/estresse, o tempo de imobilidade que os animais permaneciam no tanque foi tomado como parâmetro. Os animais que sobreviveram à sepse tratados com antibióticos apresentaram um tempo de imobilidade reduzido, quando comparado aos controles OF tratados com antibióticos [$F_{(3,39)} = 8,425, p=0,0002$]. O extrato de própolis, por sua vez, melhorou o parâmetro avaliado, fazendo com que os animais apresentassem comportamento similar aos controles OF (Figura 12).

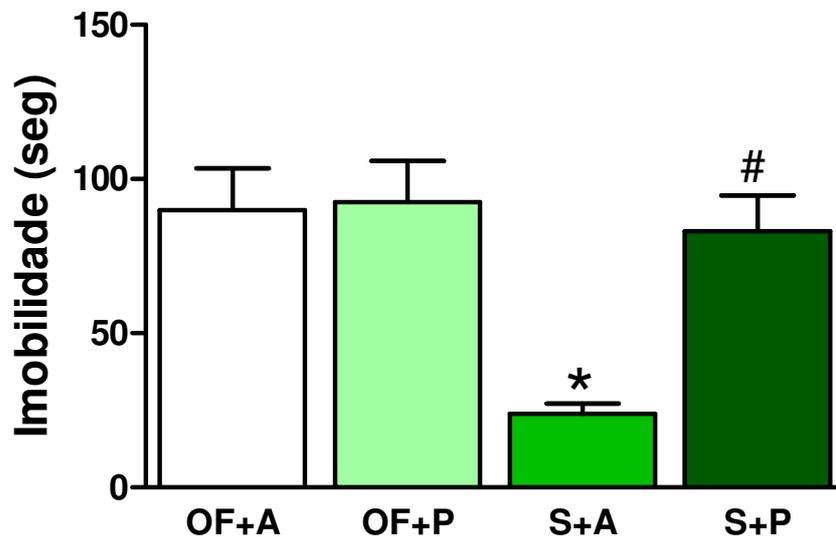


Figura 12 – Efeito do extrato de própolis (100 mg/Kg, i.p.) ou antibióticos em ratos operados com 48h e avaliados quanto ao tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado, por um período de 3 min. Os dados representam a média \pm epm de 10 animais/grupo (ANOVA, teste de Newman-Keuls). OF+A= Operação fictícia+Antibióticos, OF+P= Operação fictícia+Própolis, S+A= Sepse+Antibióticos, S+P= Sepse+Própolis.

4.4 Teste da Esquiva Inibitória do tipo *step down*

Os resultados da Esquiva inibitória mostraram que os animais que sobreviveram à sepse tratados com antibióticos apresentaram um prejuízo tanto da aquisição quanto da retenção de memória, demonstrado pela diminuição do tempo de permanência dos animais na plataforma, quando avaliados com 48 e 72h após os procedimentos cirúrgicos. Os animais que sobreviveram a sepse tratados com extrato de própolis, por sua vez, tiveram um tempo de permanência maior na plataforma, com respostas similares aquelas apresentadas pelos animais controles do grupo OF+antibióticos ($p < 0,05$) (Figura 13).

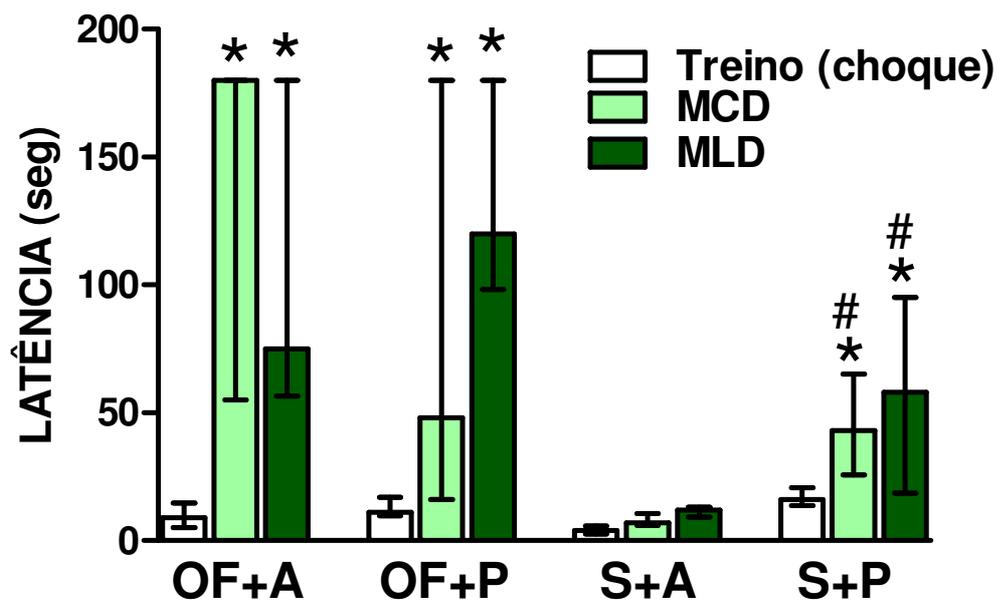


Figura 13 – Efeito do extrato de própolis (100 mg/Kg, i.p.) ou antibióticos em ratos operados com 48h (MCD) e 72h (MLD) e avaliados no teste da Esquiva Inibitória, por um período de 3 min. Os dados são representados pelas medianas (intervalos interquartis) da latência na plataforma. . * $p < 0,05$ representa diferença estatística intragrupos, em relação aos resultados observados nos treinos (antes do choque); # $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo S+A, conforme cada parâmetro avaliado (Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney). OF+A= Operação fictícia+Antibióticos, OF+P= Operação fictícia+Própolis, S+A= Sepse+Antibióticos, S+P= Sepse+Própolis. MCD= memória de curta duração; MLD= memória de longa duração.

5 DISCUSSÃO

O extrato de própolis verde apresentou um efeito benéfico contra os déficits comportamentais e cognitivos decorrentes da sepse induzida experimentalmente em ratos, o que foi demonstrado pelo bloqueio das respostas de ansiedade, estresse e prejuízo de memória. Não foram verificadas alterações nas locomoções dos animais tanto quando eles foram avaliados no testes do campo aberto, quanto nos braços fechados do LCE, descartando a possibilidade da dose do extrato ter interferido nos demais comportamentos em decorrência da locomoção prejudicada.

A propriedade anti-inflamatória do extrato de própolis que modula os comportamentos dos animais sobreviventes à sepse pode ser atribuída aos seus componentes ativos, visto que uma variedade deles tem sido identificada em amostras de diferentes origens, variando de acordo o local e o tempo da coleta. Dentre a diversidade de princípios ativos destacam-se os compostos prenilados (Artepilina C), ésteres, flavonóides (flavonas e chalconas), terpenos, β -esteróides, ácidos graxos e aromáticos (FISCHER et al., 2010; MARCUCCI et al., 2000; 2001). Apesar de no presente estudo somente o extrato ter sido avaliado, não descarta-se a hipótese de que a integração da cascata de sinalização envolvendo os componentes citados possa estar contribuindo para as respostas observadas.

Como complemento à essas propriedades da própolis na inflamação como antimicrobiana, destaca-se o fato dela ser extensamente utilizada pelas indústrias médicas e químicas, como um importante agente imunomodulador (FULIANG et al., 2005; HUTCHINS et al., 2014). Dessa maneira, sabendo ser a sepse uma inflamação sistêmica ocasionada por bacteremia, as suas atividades imunomodulatórias podem, provavelmente, atuar de modo a controlar a reação inflamatória, de forma a permitir uma maior sobrevida aos pacientes acometidos por essa patologia.

Nos últimos anos, muitas pesquisas estiveram focadas para a descoberta de novos alvos que justifiquem as sequelas da sepse (HUTCHINS et al., 2014; SFORCIN e BANKOVA, 2011). Apesar das muitas alternativas farmacológicas terem gerado perspectivas de redução da mortalidade e de suas consequências, muitas lacunas ainda são observadas nessa área (SCHORR et al., 2014).

Quando fizemos uma analogia dessa realidade observada em UTI, com os dados laboratoriais envolvendo sujeitos experimentais utilizados nesta pesquisa, observou-se que os animais que sobreviveram à sepse tratados com antibióticos apresentaram níveis de ansiedade, estresse e déficits cognitivos compatíveis com a realidade observada nos pacientes críticos sobreviventes a um quadro similar de infecção sistêmica. O extrato de própolis na situação considerada melhorou os prejuízos comportamentais e cognitivos decorrentes da sepse, apresentando respostas similares aos animais controles OF.

O comportamento de ansiedade, observado nos animais sobreviventes à sepse e tratados com antibióticos, foi caracterizado pela redução no percentual de suas entradas nos braços abertos do LCE e no tempo de permanência deles nos referidos braços. Esses resultados foram compatíveis com muitos outros em condições experimentais variadas, mostrando que respostas dessa natureza podem ser consideradas ansiogênicas, visto que a locomoção dos animais não foi afetada (BARICHELLO et al., 2007; LEITE et al., 2013).

Quando avaliados no teste do nado forçado, os mesmos animais apresentaram uma redução no tempo de imobilidade, comportamento sugestivo de estresse. Esses resultados, no teste do nado forçado, não reproduziram aqueles observados previamente por nosso grupo de pesquisa e de outros pesquisadores, quando se observou um maior tempo de imobilidade, sugestivo de apatia, que é uma das características típicas de um quadro sugestivo de depressão (COMIN et al., 2011). Essa divergência de resultados pode, provavelmente, ser em decorrência dos animais terem sido avaliados com somente 48h após os procedimentos cirúrgicos, contrapondo os demais estudos em que os sujeitos experimentais foram avaliados após uma semana.

A avaliação da locomoção dos animais é um parâmetro importante para a análise dos comportamentos aqui considerados. Corroborando parte de nossos achados, ainda considerando o nado forçado, uma observação foi feita por Lee et al. (2013), quando administraram própolis aos animais experimentais e testados no campo aberto, condição esta que eles consideraram importante para a avaliação antidepressiva do referido extrato. Os autores observaram que os

animais apresentaram comportamentos sugestivos de depressão, que foram bloqueados pelo fitoterápico, respostas que não foram afetadas pela atividade locomotora alterada. Ao contrário dos dados desses autores, nossos animais que sobreviveram à sepse apresentaram uma redução no tempo de imobilidade, sugestiva de comportamento de estresse, conforme já relatado previamente. O extrato de própolis manteve as respostas similares aos animais controles. A divergência desses resultados deve-se, provavelmente, aos procedimentos cirúrgicos e tempo de recuperação dos animais frente à infecção apresentada.

Esses resultados corroboram também aqueles em que o seu óleo essencial de própolis teve efeito terapêutico na redução dos níveis de ansiedade por antagonizar as hiperfunções do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e melhorando a habilidade de anti-oxidação dos tecidos cerebrais (LI et al., 2012). O extrato, por sua vez, mostrou um efeito antidepressivo que poderia também ser mediado pela regulação da atividade daquele eixo via os receptores glicocorticóides sinalizado pela proteína de ligação de elementos de respostas do AMPc (CREB, do inglês *cAMP response element-binding protein*) (CHEN et al., 2008).

Considerando as observações feitas na Introdução, de que muitas alterações psicocomportamentais podem afetar a memória, chama-se atenção ao fato de que os animais que sobreviveram à sepse tratados com antibióticos também mostraram uma redução na latência na plataforma do teste de esquiwa inibitória, característica de um prejuízo na MCD e MLD. O extrato de própolis, por sua vez, preveniu esses danos cognitivos, principalmente a MCD que teve resposta similar aos animais controles OF.

Esses dados envolvendo a interferência da própolis nos dados aqui observados, corroboram outros achados envolvendo o uso de medicamentos naturais para a melhora da memória. A *Ginkgo biloba*, por exemplo, apresentou propriedades neuroprotetoras melhorando o funcionamento cognitivo de animais experimentais frente aos efeitos nocivos do estresse (WARDA et al., 2002). O extrato padronizado de combinações de *Angelica gigas*, *Saururus chinensis* e *Schizandra chinensis* também apresentou características neuroprotetoras contra a morte neuronal celular e déficits cognitivos (KANG et al., 2005).

Muitos desses resultados se preocuparam em mostrar molecularmente as interferências desses produtos naturais para uma melhor consolidação das respostas terapêuticas observadas. Nossa pesquisa, entretanto, pouco avançou nesta etapa, mas os resultados parciais mostram que o extrato de própolis pode interferir nas citocinas e em alguns eventos bioquímicos decorrentes da inflamação, nos conduzindo a uma investigação mais detalhada a este respeito (dados não demonstrados).

Está bem estabelecido que as citocinas orquestram e perpetuam as características inflamatórias crônicas de diversas doenças (MISSIMA et al., 2009; 2010). A ação anti-inflamatória da própolis tem sido investigada por vários pesquisadores, utilizando diferentes modelos animais (HU et al., 2005; KHAYYAL et al., 1993, MIYATAKA et al., 1997; PAULINO et al., 2006). Quando administrada em ratos, na dose de 200 mg/kg, durante 3 dias, ela inibiu a produção de IFN- γ em culturas de esplenócitos (ORSATTI et al., 2010b). Culturas realizadas nessas células de camundongos C57BL/6 tratados com própolis verde brasileira na mesma dose, durante 14 dias, houve uma inibição na produção de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-2 e IL-10 (MISSIMA et al., 2010; ORSATTI et al., 2012).

As atividades antimicrobianas da própolis são bem documentadas contra diversas bactérias (SFORCIN et al., 2000; WAGH, 2013), leveduras (SFORCIN et al., 2001), vírus (BÚFALO et al., 2009; GEKKER et al., 2005) e parasitas (FREITAS et al., 2006). *In vitro*, a própolis pode atuar diretamente sobre os microrganismos, e *in vivo* podem estimular o sistema imunitário a ativar os mecanismos envolvidos na morte dos microrganismos .

Este fitoterápico também pode apresentar efeitos sinérgicos com medicamentos antimicrobianos. Oksuz et al. (2005) verificaram uma atividade sinérgica entre a ciprofloxacina e própolis no tratamento da ceratite experimental provocada por *Staphylococcus aureus*. Orsi et al. (2006) relataram que a própolis diminuiu a resistência da parede celular de bactérias facilitando a ação dos antibióticos (amoxicilina, ampicilina e cefalexina) e ela teve também efeitos sinérgicos com os antibióticos que atuam sobre o ribossoma (cloranfenicol, tetraciclina e neomicina) No entanto, a própolis não parece interagir com os

antibióticos que atua sobre o DNA (ciprofloxacina e norfloxacina) e ácido fólico (cotrimoxazol). Nossa pesquisa não teve como objetivo fazer uma interação da própolis com os antibióticos clindamicina e gentamicina usados nos animais, mas sim avaliar se o seu perfil de resposta na inflamação era parecido com o apresentado por aquela associação de antibacterianos. No entanto, não descartar-se a possibilidade dessa avaliação realizada por Orsi e seus colaboradores.

Tendo em vista que esta é a primeira pesquisa “*in vivo*” no investimento terapêutico da própolis na área envolvendo sepse e as sequelas decorrentes da encefalopatia séptica, esses achados podem se constituir, provavelmente, em um alvo de pesquisa promissor para investimentos das indústrias farmacêuticas na área farmacológica envolvendo infecção sistêmica.

6 CONCLUSÕES

Em um contexto geral, o extrato de própolis pode prevenir as alterações comportamentais e cognitivas resultantes da sepse experimental, induzida experimentalmente em ratos por meio da cirurgia de ligadura e perfuração cecal, cabendo investigar os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos com as respostas produzidas por esta terapia natural. Esses resultados foram baseados nas seguintes observações:

1. Os animais que sobreviveram à sepse tratados com antibióticos apresentaram diminuição nas percentagens de entradas nos braços abertos e tempo de permanência nos referidos braços do labirinto em cruz elevado. Essa resposta pareceu ser sugestiva de ansiedade (ansiogênica), visto que tanto a locomoção quanto a frequência de entrada nos braços fechados do labirinto não foram afetadas.
2. Os mesmos animais apresentaram comportamento sugestivo de estresse no teste do Nado forçado, que foi caracterizado por uma redução no tempo de imobilidade. É possível que esses resultados tenham sido reflexo do tempo de recuperação dos animais (48h), mas que corroborou com aqueles observados no teste do labirinto em cruz elevado.
3. A sepse induzida experimentalmente nos animais tratados com antibióticos induziu prejuízos na memória de curta e de longa duração no teste da Esquiva inibitória do tipo *step down*, observados pela redução no tempo de latência na plataforma do aparato.
4. O extrato de própolis impediu a resposta ansiogênica decorrente da sepse induzida experimentalmente, quando elevou as percentagens de entradas nos braços abertos e tempo de permanência nos referidos braços do labirinto em cruz elevado, mantendo uma resposta similar aos animais controles de operação fictícia tratados com própolis. Tanto a locomoção quanto a frequência de entrada nos braços fechados do labirinto também novamente não foram afetadas.

5. O efeito sugestivo de estresse dos ratos sobreviventes à sepse tratados com antibióticos, caracterizado pela redução do tempo de imobilidade, foi bloqueado pelo extrato de própolis, mantendo uma resposta similar aos animais controles tratados com o mesmo extrato.
6. Os animais que sobreviveram à sepse tratados com extrato de própolis tiveram um tempo de permanência maior na plataforma quando comparados aos animais sobreviventes à sepse tratados com antibióticos, tanto na memória de curta quanto de longa duração, sugerindo um efeito mnemônico da própolis.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A própolis contém um largo espectro de compostos com muitas atividades biológicas. É considerado um produto útil e já é utilizado em medicina alternativa. Recentemente tem havido um interesse crescente na sua utilização pelas indústrias de processamento de alimentos, cosméticos e farmacêuticos. Considerando isso, mais estudos sobre os componentes bioativos da própolis são necessários para identificar interações mediadoras e os seus efeitos biológicos. Outros estudos em animais experimentais também são necessários em verificar a sua biodisponibilidade, estabilidade em diferentes preparações, doses seguras e eficazes para a prevenção ou tratamento de doença em humanos.

Foi observado que as propriedades biológicas desse fitoterápico têm sido intensamente investigada nos últimos anos, atraindo um grande interesse dos consumidores em produtos contendo própolis comercializados por lojas de produtos naturais e apontando o seu potencial terapêutico para o desenvolvimento de novos medicamentos. No entanto, a fim de estabelecer requisitos mínimos ou padrões de configuração para iniciar a investigação de novos medicamentos, alguns pontos consideramos importantes serem ressaltados:

Em primeiro lugar, os constituintes químicos das diferentes espécies devem ser mais explorados, visto que as suas propriedades biológicas podem ser associadas as suas composições químicas e fontes botânicas. Se prender nos estudos que envolvam somente extratos naturais inviabiliza uma possibilidade de melhor investimento dos seus princípios ativos, que são os maiores alvos das indústrias farmacêuticas, em busca de terapias cada vez mais eficazes para o tratamento de doenças diversificadas.

Em segundo lugar, diz respeito a um problema jurídico para o registro da própolis como "ervas", isto porque ela é considerada como produto oriundo de abelha (portanto, animal), e não um produto essencialmente à base de plantas, para assim ser considerada "erva". Para tornar-se um medicamento, as própolis de diferentes origens e regiões não devem ser usadas como uma mistura de todos os constituintes. Por conta disso, acredita-se que os seus compostos isolados poderiam tornar-se uma opção para medicamentos modernos, sem

muitos eventos adversos normalmente apresentados por muitas alternativas sintéticas, em especial quando se trata de antimicrobianos.

Em terceiro lugar, é bem sabido que os ensaios *in vitro* são fundamentais para o fornecimento de resultados sobre os mecanismos de ação, e aqueles *in vivo* têm fornecido informações sobre as propriedades biológicas do produto investigado. No entanto, apesar das várias pesquisas envolvendo o uso de própolis para vários males há pouca informação disponível sobre a sua eficiência clínica.

Tendo em vista que os dados aqui apresentados constituem a primeira pesquisa "*in vivo*" no investimento terapêutico da própolis na área envolvendo sepse e as sequelas decorrentes da encefalopatia séptica, esses achados podem se constituir, provavelmente, em um alvo de pesquisa promissor para investimentos na área farmacológica na área de infecção sistêmica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aga DS, Wegst-Uhrich SR, Navarro DA, Zimmerman L. Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chem Cent J*, 8:1-12, 2014.

Akarasereenont P, Mitchell JA, Bakhle C, Thiemermann C, Vane JR. Comparison of the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. *Eur J Pharmacol*, 273:121–128, 1995.

Anauate Netto C, Marcucci MC, Paulino N, Anido-Anido A, Amore R, de Mendonça S, Borelli NL, Bretz WA. Effects of typified propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. *Braz Dent Sci*, 16:31-36, 2013.

Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z Naturforsch C*, 58:580-589, 2003.

Atungulu G, Miura M, Atungulu E, Satou Y, Suzuki K. Activity of gaseous phase steam distilled propolis extracts on peroxidation and hydrolysis of rice lipids. *J Food Eng*, 80:850–858, 2007.

Atungulu Griffiths G, Toshitaka U, Fumihiko T, Daisuke H. Effect of vapors from fractionated samples of propolis on microbial and oxidation damage of rice during storage. *J Food Eng*, 88:341–352, 2008.

Bankova V, Marcucci MC, Simova S, Nikolova N, Kujumgiev A, Popov S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*, 51:277-280, 1996.

Bankova VS, De Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31:3-15, 2000.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*, 100:114-117, 2005.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*, 33: 221-223, 2005.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JCF, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res*, 40: 831-837, 2007.

Braun T, Schett G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep*, 10:101–108, 2012.

Búfalo MC, Figueiredo AS, De Sousa JP, Candeias JM, Bastos JK, Sforcin JM, Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis cell viability determination and real-time PCR. *J Appl Microbiol*, 107:1669-1680, 2009.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis) *Food Chem Toxicol*, 36:347–363,1998.

Chan GC, Cheung KW, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol*, 44:262-273, 2013.

Chanyshv ZG, Kudashev AK. [Chemical composition of propolis]. *Veterinariia*, 8:100,1976.

Chen J, Long Y, Han M, Wang T, Chen Q, Wang R. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 90:441-446, 2008.

Comim CM, Omar J, Cassol-Jr O, Constantino C, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F Depressive-Like Parameters in Sepsis Survivor Rats . *Neurotox Res*, 17:279-286, 2011.

Conde KA, Silva E, Silva CO, Ferreira E, Freitas FG, Castro I, Rea-Neto A, Grion CM, Moura AD, Lobo SM, Azevedo LC, Machado FR. Differences in sepsis treatment and outcomes between public and private hospitals in Brazil: a multicenter observational study. *PLoS One*, 8: e64790, 2013.

Daleprane JB, Abdalla DS. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evid Bas Complement Alternat Med*, 1-22, 2013.

De Funari CS, Oliveira FDV, Mathor MB. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *J Ethnopharmacol*, 111:206-212, 2007.

Dickerson FB, Boronow JJ, Stallings CR, Origoni AE, Cole S, Yolken RH. Association between cognitive functioning and employment status of persons with bipolar disorder. *Psychiatr Serv*. 55: 54-58, 2004.

Fabre AJ. Mythology and the medicinal plants of antiquity. *Hist Sciences Med*, 37:65–87, 2003.

Farooqui T, Farooqui AA. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Front Biosci*, 4:779-793, 2012.

Ferreira RC, Rosane R, Mello R, Silva KS Neonatal sepsis as a risk factor for neurodevelopmental changes in preterm infants with very low birth weight. *J Pediatric*, 1-7, 2014.

Fischer G, Paulino N, Marcucci MC, Siedler BS, Munhoz LS, Finger PF, Vargas GD, Hübner SO, Vidor T, Roehe PM. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105:908-913, 2010.

Fontes-Jr, EA, Souza PJ, Do Nascimento JL, Santos SN, Espíndola LS, Ferreira VM. Antinociceptive and Antiinflammatory Properties of the Ethanollic of *Pouperia ramiflora* Roots. *Lat Am J Pharm*, 28:812-818, 2009.

Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimarães S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, 13:170–175, 2006.

Fuliang HU, Hepburn HR, Yinghua L, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol*, 100:276-283, 2005.

Galal A, Abd El-Motaal AM, Ahmed AMH, Zaki TG. Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. *Int J Poult Sci*, 7:272-278, 2008.

Garedew A, Schmolz E, Lamprecht I. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. *Thermochim Acta*, 422:115–124, 2004.

Gekker G, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR, Peterson PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol*, 102:158–163, 2005.

Giorgetti M, Negri G, Rodrigues E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: a study of historical sources from the 16th to 19th century. *J Ethnopharmacol*, 109: 338-347, 2007.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 327:1-5, 1984.

Hausen BM, Wollenweber E, Senff H, Post B. Propolis allergy. (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis*, 17:171-177, 1987.

Heinrich M, Kufer J, Leonti M, Pardo-de-Santayana M. Ethnobotany and Ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol*, 107:157–160, 2006.

Helfenberg KD. The analysis of beeswax and propolis. *Chem Zeitung*, 31:987-998, 1908.

Hentges CR, Silveira RC, Procianoy RS, Carvalho CG, Filipouski GR, Fuentefria RN, Marquezotti F, Terrazan AC Association of late-onset neonatal sepsis with late neurodevelopment in the first two years of life of preterm infants with very low birth weight. *J Pediatr*, 90:50-57, 2014.

Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effect of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol*, 100:276-283, 2005.

Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med*, 1-10, 2014.

Kallen VL, Tulen JH, Utens EM, Treffers PD, De Jong FH, and Ferdinand RF. Associations between HPA axis functioning and level of anxiety in children and adolescents with an anxiety disorder. *Depress Anxiety*, 25:131–141, 2008.

Kang SY, Lee KY, Koo KA, Yoon JS, Lima SW, Kima YC et al. ESP-102, a standardized combined extract of *Angelica gigas*, *Saururus chinensis* and *Schizandra chinensis*, significantly improved scopolamine-induced memory impairment in mice. *Life Sci*, 76:1691–1705, 2005.

Karnatovskaia LV, Festic E. Sepsis: a review for the neurohospitalist. *Neurohospitalist*, 2:144-153, 2012.

Kathleen GN, Catalfamo DL, Holliday S, Wallet SM, Pileggi R. Propolis decrease lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in pulp cells and osteoclasts. *Dent Traumatol*, 1-6, 2014.

Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*, 7:22-31, 2006.

Khayyal MT, El-Ghazaly MA, El-Khatib AS. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res*, 19:197-203, 1993.

Kirby LG, Lucki I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. *Stress*, 2:251-263, 1998.

Kisore P, Lal N, Trivedi JK, Dalal PK, Aga VM. A study of comorbidity in psychoactive substance dependence patients. *Indian J Psychiatry*, 36:133-137, 1994.

Koenig B, Dustmann H. Propolis und Viren: der Gegenwoertige Forschungsstand. *Apidologie*, 17:334–336, 1986.

Kufer J, Förther H, Pöll E, Heinrich M. Historical and modern medicinal plant uses - the example of the Ch'ortí Maya and Ladinos in Eastern Guatemala. *J Pharmacy Pharmacol*, 57:1127–1152, 2005.

Kury L. Viajantes-naturalitas no Brasil oitocentista: experiencia, relato e imagem. *História, Ciência, Saúde-Manguinhos*, 8: 863–880, 2001.

Lee MS, Kim YH, Park WS, Ahn WG, Park OK, Kwon SH, Morita K, Shim I, Her S. Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. *Evid Based Complement Alternat Med*, 1-19, 2013.

Leite FB, Prediger RD, Silva MV, de Sousa JB, Carneiro FP, Gasbarri A, Tomaz C, Queiroz AJ, Martins NT, Ferreira VM. Role of nicotine on cognitive and behavioral deficits in sepsis-surviving rats. *Brain Res*, 1507:74-82, 2013.

Li YJ, Xuan HZ, Shou QY, Zhan ZG, Lu X, Hu FL. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Hum Exp Toxicol*, 31:157-165, 2012.

Lucena GM, Gadotti VM, Maffi LC, Silva GS, Azevedo MS, Santos AR. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. *J Ethnopharmacol*, 112:19-25, 2007a.

Lucena GM, Franco JL, Ribas CM, Azevedo MS, Meotti FC, Gadotti VM, Dafre AL, Santos ARS, Farina M. *Cipura paludosa* extract prevent methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 101:127-131, 2007b.

Lucena GM, Porto FA, Campos EG, Azevedo MS, Cechinel-Filho V, Prediger RD, Ferreira VM. *Cipura paludosa* attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73: 1150-1158, 2010.

Lucena GM, Prediger RD, Silva MV, Santos SN, Silva JF, Santos AR, Azevedo MS, Ferreira VM. Ethanolic extract from bulbs of *Cipura paludosa* reduced long-lasting learning and memory deficits induced by prenatal methylmercury exposure in rats. *Dev Cogn Neurosci*, 3:1-10, 2013.

Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Propolis: updates on chemistry and pharmacology. *Rev Bras Farmac*, 18:447-454, 2008.

Maggio M, Colizzi E, Fisichella A, Valenti G, Ceresini G, Dall'Aglio E, Ruffini L, Lauretani F, Parrino L, Ceda GP. Stress hormones, sleep deprivation and cognition in older adults. *Maturitas*, 76: 22-44, 2013.

Maia CS, Lucena GM, Corrêa PBF, Serra RB, Matos RWM, Menezes FC, Santos SN, Sousa JB, Costa ET, Ferreira VM. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology*, 30:23-30, 2009.

Manolova N, Maximova V, Manolova Z, Stoilova I, Korczak E, Denis A. Immunobiological effect of propolis. I. Effect on Cellular immunity. *Acta Microbiol Bulg*, 21:76–81, 1987.

Marcucci M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26:83–99, 1995.

Marcucci MC, Bankova VS. Chemical Composition, Plant Origin and Biological Activity of Brazilian Propolis. *Curr Top Phytochem*, 2:116-123, 2000.

Marcucci MC, Ferreres F, Custódio AR, Ferreira MM, Bankova VS, García-Viguera C, Bretz WA. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z Naturforsch C*, 55:76-81, 2000.

Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*, 74:105-112, 2001.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States: from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348: 1546-1554, 2003.

Martins VF, Ferreira VM, Guilhem DB. Psychophysiological consequences arising from the stress of everyday life and work activities. *Salud Mental (México)*, 36: 141-147, 2013.

Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nippon Med Sch*, 79:4-18, 2012.

Maximova V, Todorova V, Manolova N, Gegova G, Serkedjieva Y, Uzunov S et al. Antiviral action of some fractions isolated from propolis. *Acta Microbiol Bulg*, 17:79–84, 1985.

Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5:4-11, 2014.

McBride WJ, Li TK. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Crit Rev Neurobiol*, 12:339-369, 1998.

Mckenzie C. Antibiotic dosing in critical illness. *J Antimicrob Chemother*, 66:25-32, 2011.

Medic-Saric M, Rastija V, Bojic M, Males Z. From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutr J*, 8:1-33, 2009.

Melliou E, Stratis E, Chinou I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece—antimicrobial activity. *Chin Food Chem*, 103: 375–380, 2007.

Middleton Jr E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52:673–751, 2000.

Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Sforcin JM. The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. *J ApiProduct and ApiMed Sci*, 1:11–15, 2009.

Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Araújo JP Jr., Sforcin JM. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines' expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress *Phytother Res*, 24:1501–1507, 2010.

Mitchell DC, Knight CA, Hockenberry J, Teplansky R, Hartman TJ. Beverage caffeine intakes in the U.S. *Food Chem Toxicol*, 63:136-142, 2014.

Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physic-chemical methods. *Biol and Pharm Bull*, 20:496–501, 1997.

Monsey MS, Boyle LM, Zhang ML, Nguyen CP, Kronman HG, Ota KT, Duman RS, Taylor JR, Schafe GE. Chronic corticosterone exposure persistently elevates the expression of memory-related genes in the lateral amygdala and enhances the consolidation of a pavlovian fear memory. *PLoS One*. 9(3): e91530, 2014.

Moreira TF. Chemical composition of propolis, vitamins and amino acids. *Rev Bras Farmacogn*, 1:12-19, 1986.

Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR. Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet*, 379: 445-452, 2012.

Nater UM, Skoluda N, Strahler J. Biomarkers of stress in behavioural medicine. *Curr Opin Psychiatry*, 26: 440-445, 2013.

Navarro-Francés CI, Arenas MC. Influence of trait anxiety on the effects of acute stress on learning and retention of the passive avoidance task in male and female mice. *Behav Processes*, pii: S0376-6357(14)00045-X, 2014.

Nikolaev AB. Defending the bee town. In *Remarkable hive product: Propolis Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics*. APIMONDIA Standing Commission on Beekeeping Technology and Equipment, 1978: Bucharest.

Oksuz H, Duran N, Tamer C, Cetin M, Silici S. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. *Ophthalmic Res*, 37:328–334, 2005.

Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Bachiega TF, Búfalo MC, Araújo JP Jr, Sforcin JM. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res*, 24:1141–1146, 2010a.

Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Sforcin JM. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J Ethnopharmacol*, 129:314–318, 2010b.

Orsatti CL, Sforcin JM. Propolis immunomodulatory activity on TLR-2 and TLR-4 expression by chronically stressed mice. *Nat Prod Res*, 26:446-453, 2012.

Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *The J Ven Anim and Toxins*, 6:205–219, 2000.

Orsi RO, Funari SR, Barbattini R, Giovani C, Frilli F, Sforcin JM, Bankova V. Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L). *Bull Environ Contam Toxicol*, 76:637-640, 2006.

Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*, 28:3019-3024, 2000.

Paulino N, Teixeira C, Martins R, Scremin A, Dirsch VM, Vollmar AM, Abreu SR, de Castro SL, Marcucci MC. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Plant Med*, 72:899-906, 2006.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an. *J Neuroscience Methods*, 14: 149-167, 1985.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63:1035–1042, 2000.

Pinheiro da Silva F, Machado MC, Velasco IT. Neuropeptides in sepsis: from brain pathology to systemic inflammation. *Peptides*, 44:135-138, 2013.

Popova MP, Bankova VS, Bogdanov SB, Tsvetkova I, Naydenski CN, Marcazzan GL et al. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38:306–311, 2012a.

Popova M, Trusheva B, Cutajar S, Antonova D, Mifsud D, Farrugia C et al. Identification of the plant origin of the botanical biomarkers of Mediterranean type propolis. *Nat Prod Commun*, 7:569–570, 2012b.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 5604:730-732, 1977.

Redrobe JP, Bourin M. Dose-dependent influence of buspirone on the activities of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology*, 138: 198-206, 1998.

Scaglione F. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) considerations in the management of Gram-positive bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*, 2:33-39, 2010.

Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*, 41:1361–1366, 2011.

Schneider JJ, Candiago RH, Rosa AR, Ceresér KM, Kapczinski F. Cognitive impairment in a Brazilian sample of patients with bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr*, 30: 209-214, 2008.

Schorr CA, Zanotti S, Dellinger RP. Severe sepsis and septic shock: Management and performance improvement. *Virulence*, 5:190-199, 2014.

Sforcin JM, Fernandes AJr, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, 73:243–249, 2000.

Sforcin JM, Fernandes AJr, Lopes CAM, Funari SRC, Bankova V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Ven Anim Toxins*, 7:139–144, 2001.

Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*, 133: 253 -260, 2011.

Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, Sousa EF, Abe TP, Andrade J, Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel AM. Brazilian sepsis epidemiological study (Bases study). *Crit Care*, 8:251-260, 2004.

Stein MB. Public health perspectives on generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry*, 65:3–7, 2004.

Suvisaari J, Mantere O. Inflammation theories in psychotic disorders: a critical review. *Infect Disord Drug Targets*, 13: 59-70, 2013.

Teles JM, Silva E, Westphal G, Costa Filho R, Machado FR. Surviving sepsis campaign in Brazil. *Shock*, 30: 47-52, 2008.

Textoris J, Wiramus S, Martin C, Leone M. Antibiotic therapy in patients with septic shock. *Eur J Anaesthesiol*, 28: 318-324, 2011.

Thompson JM, Gallagher P, Hughes JH, Watson S, Gray JM, Ferrier IN, Young AH. Neurocognitive impairment in euthymic patients with bipolar affective disorder. *Br J Psychiatry*, 186:32-40, 2005

Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharm Biochem Behav*, 44: 463-469, 1993.

Verma P, Hellems KG, Choi FY, Yu W, and Weinberg J. Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiol Behav*, 99: 276–285, 2010.

Wagh VD. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Avd Pharmacol Sci*, 1-28, 2013.

Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, Yu B, Fan Y, Sun X. Functional Polymorphisms of Interferon-gamma Affect Pneumonia-Induced Sepsis. *PLoS One*, 9:1-20, 2014.

Warda CP, Reddb K, Williams a BM, JCalera JR, Luob Y, McCoy JG. Ginkgo biloba extract: cognitive enhancer or antistress buffer. *Pharmacol Biochem Behav*, 72:913–922, 2002.

Wiersinga WJ. Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr Opin Crit Care*, 5:480-486, 2011.

World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization among depression in Brazil. *WHO*, 91:93-101, 2013.

Yildiz O, Karahalil F, Can Z, Sahin H, Kolayli S. Total monoamine oxidase (MAO) inhibition by chestnut honey, pollen and propolis. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 1-5, 2013.

York JM, Blevins NA, Baynard T, Freund GC. Mouse testing methods In psychoneuroimmunology: an overview of how to measure sickness, depressive/anxietal, cognitive, and physical activity behaviors. *Methods Mol Biol*, 934: 243-276, 2012.

Zarate CA, Tohen M, Land M, Cavanagh S. Functional impairment and cognition in bipolar disorder. *Psychiatr Quarterly* 2000;71(4):309-29, 2000.

Ziaja M. Septic encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 13:1-23, 2013.

ANEXO



Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM



Brasília, 14 de julho de 2011

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Potencial terapêutico da própolis na sepse experimental”, UnBDoc 82561/2011, sob responsabilidade Professora Vânia Maria Moraes Ferreira, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM