

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

Mestrado

**EFEITO PROTETOR DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) EM
MODELO MURINO DE SEPSE LETAL INDUZIDA POR
LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL**

LIANA DE OLIVEIRA TROVÃO

**SÃO LUÍS – MA
2018**

LIANA DE OLIVEIRA TROVÃO

**EFEITO PROTETOR DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) EM
MODELO MURINO DE SEPSE LETAL INDUZIDA POR
LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Gonçalves Maciel

São Luís – MA
2018

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

Trovão, Liana de Oliveira.

EFEITO PROTETOR DE *Punica granatum* L. ROMÃ EM MODELO MURINO DE SEPSE LETAL INDUZIDA POR LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL / Liana de Oliveira Trovão. - 2018.

97 p.

Orientador(a): Márcia Cristina Gonçalves Maciel.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Imunomodulação. 2. Inflamação. 3. Romã. 4. Sepsis. I. Maciel, Márcia Cristina Gonçalves. II. Título.

LIANA DE OLIVEIRA TROVÃO

**EFEITO PROTETOR DE *Punica granatum* L. (ROMÃ) EM
MODELO MURINO DE SEPSE LETAL INDUZIDA POR
LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL**

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

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Márcia Cristina Gonçalves Maciel
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profª Drª Andresa Aparecida Berretta e Silva
Faculdade de Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto - USP

Profª Drª Hivana Patrícia Melo Barbosa Dall'Agnol
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dedico esta dissertação a todos os pesquisadores que lutam, como verdadeiros guerreiros, para a realização da Ciência no Brasil, em qualquer instância, apesar das inúmeras dificuldades, apesar das impossibilidades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, quem possibilita, abençoa e protege todos os dias da minha vida, com sua misericórdia, graça e amor.

Agradeço às instituições de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento da bolsa durante o período de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento do projeto. Além disso, agradeço à Universidade Federal do Maranhão e ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) por cederem a infra-estrutura necessária para a realização dos experimentos e completo desenvolvimento da pesquisa. Agradeço também à empresa Apis Flora® em nome da Professora Dr^a Andresa Berretta por ceder o extrato bruto padronizado de *Punica granatum* utilizado em todos os experimentos.

Agradeço à Prof^a Dr^a Márcia Cristina Gonçalves Maciel, minha orientadora e mãe científica, por toda paciência, dedicação e cuidado empregados nesse trabalho e a mim nos dois anos de mestrado. Foi muito gratificante poder crescer ao seu lado e aprender com o seus conselhos e correções. Me sinto orgulhosa de tê-la como orientadora pois és fonte de grande inspiração.

Agradeço às professoras e aos professores do Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da Universidade Federal do Maranhão (Flávia Nascimento, Rosane Guerra, Paulo Vítor, Ana Paula Azevedo, Lucilene Amorim) por todos os ensinamentos passados, seja por meio de uma discussão em seminário, seja na bancada, numa conversa informal ou mesmo num puxão de orelha. São todos muito valiosos e é muito gratificante fazer parte disso.

Agradeço a todos os amigos LIFianos, (Patrícia, Lillian, Douglas, Aluísio, Luana, Jefferson, André, Carol, Andressa, Luís Victor, César Alejandro, Johnny, Gisele, Paula, Gustavo, Éder Fialho) por fazerem desse laboratório um lugar tão especial, por fazerem esses anos muito mais prazerosos, leves e felizes. Sem vocês tudo seria muito mais difícil. Agradeço também às técnicas de laboratório Carlene Peixoto, Renata e Sônia, que sempre se mantiveram dispostas e solícitas para ajudar no que fosse necessário.

Agradeço especialmente aos companheiros de experimento Patrícia, Aluísio, Luís, César e Dimitrius por formarem essa equipe de “sépticos”, sempre dispostos e incansáveis durante as noites e os dias inteiros no laboratório. Vocês são demais!

Agradeço às Honeys, minhas eternas amigas do peito, Andressa Oliveira, Heloísa Vasconcelos, Jhessica Mariana e Juliana Azevedo por, SEMPRE estarem presentes em todos

os momentos importantes da minha vida, por me ajudarem a ser alguém melhor e me fazer saber que posso contar com vocês pro resto da vida, onde quer que eu esteja!

Agradeço aos meus amigos do PG Inabusáveis, sendo representados pelos nomes de Paulo Portela, Amanda Oliveira e Paulo Lima, que sempre me deram suporte e acompanharam de perto a minha jornada, tanto na igreja como fora dela, torcendo de coração pelas minhas vitórias e conquistas. Vocês são extremamente especiais para mim e eu os amo muito!

Agradeço aos amigos da Biologia Alan de Castro, Mairla, Emily, Thayrine, Clarisse, Marco Antônio e Diego Marinho por sempre me incentivarem nos estudos e por me aturarem falando sobre minhas dificuldades na UFMA e sobre minha pesquisa, mesmo sem entenderem muita coisa. Obrigada pelo carinho, confiança e fé que vocês têm em mim!

Agradeço à minha família, em especial minha mãe, Anid Trovão, que nunca mediu esforços e SEMPRE fez tudo o que estava ao seu alcance para me proporcionar as melhores condições de estudo, sempre muito preocupada, amorosa e carinhosa comigo. Ao meu Pai, Carlos Trovão e meu irmão Leandro Trovão, por terem ajudado, sempre que necessário sendo compreensivos e prestativos comigo, sempre entendendo quando eu tive que ficar com o carro o dia todo, por ter que passar o dia todo na UFMA.

A todos vocês o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1	SEPSE	4
2.1.1	<i>Perspectiva histórica da definição de sepse.....</i>	4
2.1.2	<i>Epidemiologia da Sepse</i>	8
2.1.3	<i>Aspectos imunofisiológicos da sepse.....</i>	10
2.1.4	<i>Modelos experimentais de sepse.....</i>	15
2.1.5	<i>Antimicrobianos e a sepse</i>	17
2.2	ESPÉCIE VEGETAL	18
2.2.1	<i>Punica granatum L.</i>	18
2.2.2	<i>Componentes químicos e atividades biológicas</i>	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	GERAL:	21
3.2	ESPECÍFICOS:	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	EXTRATO VEGETAL.....	22
4.2	ANIMAIS	22
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL	22
4.4	INDUÇÃO DA SEPSE LETAL POLIMICROBIANA	24
4.5	QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)	24
4.6	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	25
4.7	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PERITONEAIS E DO LAVADO BRONCO ALVEOLAR (LBA) ..	25
4.8	CONTAGEM DE CÉLULAS DO BAÇO, DO LINFONODO E DA MEDULA ÓSSEA	25
4.9	AVALIAÇÃO DO BURST OXIDATIVO POR “DIHYDRORHODAMINE” 123 (DHR)	26
4.10	DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS DO SORO.....	26
4.11	IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DO PERITÔNIO, BAÇO E LINFONODO	26
4.12	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	29
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5	RESULTADOS	30
5.1	EBPG AUMENTA SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS SÉPTICOS.....	30
5.2	EBPG REDUZ CRESCIMENTO BACTERIANO NO SANGUE, BAÇO, LAVADO BRONCO ALVEOLAR E PERITÔNIO	31
5.3	EBPG AUMENTA QUANTIDADE DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO	32
5.4	EBPG AUMENTA QUANTIDADE DE CÉLULAS TOTAIS NO FOCO INFECCIOSO E REDUZ NO BAÇO	33

5.5	EBPG NÃO ALTERA A CELULARIDADE NO LAVADO BRONCO ALVEOLAR, MEDULA ÓSSEA E LINFONODOS	34
5.6	EBPG INDUZ AUMENTO DO NÚMERO DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS NO PERITÔNIO 35	
5.7	EBPG AUMENTA PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T HELPER ATIVADOS E DIMINUI PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS NO PERITÔNIO	36
5.8	EBPG REDUZ PERCENTUAL DE LINFÓCITOS AUXILIARES ATIVADOS E LINFÓCITOS CITOTÓXICOS ATIVADOS E AUMENTA PERCENTUAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ATIVADAS NOS LINFONODOS MESENTÉRICOS.	37
5.9	EBPG AUMENTA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS APRESENTADORAS NO BAÇO	38
5.10	EBPG AUMENTA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E PRINCIPALMENTE DA CITOCINA REGULATÓRIA IL-10 NO SORO DE ANIMAIS SÉPTICOS	39
5.11	EBPG CONTROLA PRODUÇÃO EXACERBADA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM CÉLULAS DO PERITÔNIO	40
5.12	EBPG DIMINUI HEMORRAGIA NO PULMÃO DE ANIMAIS SÉPTICOS	41
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO.....	46
8	REFERÊNCIAS	47
9	APÊNDICES	55
	ARTIGO	59
10	ANEXO.....	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APCs	Antigen Presenting Cells (Células Apresentadoras de Antígenos)
ATB	Antibiótico
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain heart infusion (Infusão de Cérebro e Coração)
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis (Peritonite por stent no colon ascendente)
CBA	Cytometric Beads Array
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CLP	Cecal Ligadure and Puncture (Ligadura e Perfuração Cecal)
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DHR	Dihydrorhodamine 123
DIC	Disseminated intravascular coagulation (Coagulação intravascular disseminada)
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
EBPg	Extrato Bruto de <i>Punica ganatum</i>
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
H₂O₂	Peróxido de Oxigênio
IL	Interleucina
INF-β	Interferon beta
INF-γ	Interferon gama
LBA	Lavado Bronco Alveolar
LPS	lipopolissacarídeo
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1 (Proteína quimioatrativa de monócitos)
MFI	Mean Florescence Intensity (Média de intensidade de fluorescência)
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II (Complexo principal de histocompatibilidade tipo II)
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina)_
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	Nuclear fator kappa B

NK	Natural Killer
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	phosphate buffered saline (tampão fosfato salina)
PGE2	Prostaglandina E2
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment Score
rpm	Rotações por minuto
RRP	Receptores de Reconhecimento de Padrões
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
TGF- β	Transforming growth factor beta (Fator transformador de crescimento - beta)
TLR-4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Tumor necrosis fator alfa (Fator de necrose tumoral)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Critérios e respectivas pontuações para o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). O SOFA avalia parâmetros como respiração, coagulação, fígado, função cardiovascular, sistema nervoso central e rins. Para cada parâmetro são dispostos critérios e sinais que são atribuídos de uma determinada pontuação que varia de 0 a 4. Quanto maior for a pontuação do paciente no SOFA, maior será a probabilidade de morte. Fonte: adaptado de SINGER et al., 2016.....	7
Tabela 2. Painel de marcadores para as células do baço e linfonodos	27
Tabela 3. Painel de marcadores das células do lavado peritoneal	27
Tabela 4. Efeito do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de <i>P. granatum</i> no tecido de pulmão e ceco de animais sépticos ou não sépticos, tratados ou não tratados. Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. Foi aplicado o teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis e teste t Student adotando $p \leq 0,05$ como significância.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inter-relação entre Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), seps e infecção estabelecido no primeiro consenso de seps.	5
Figura 2. Consequências dos altos níveis de ERO e ERN na seps.	12
Figura 3. Interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T.	13
Figura 4. Efeitos da seps no sistema imunológico e possível terapia alvo com a utilização de interleucina 7 (IL-7).	15
Figura 5. Modelos experimentais de seps:	16
Figura 6. Aspectos morfológicos da espécie vegetal <i>Punica granatum</i>.	19
Figura 7. Esquemas representativos do desenho experimental dos ensaios de sobrevida e de avaliação de parâmetros celulares/imunológicos/funcionais.	23
Figura 8. Gráficos de aquisições de populações a serem analisadas na imunofenotipagem.	28
Figura 9. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> (EBPg) na sobrevida de animais sépticos.	30
Figura 11. Contagem diferencial de células do sangue.	32
Figura 12. Número de células do baço e da cavidade peritoneal.	33
Figura 13. Número de células no lavado bronco alveolar, medula óssea e linfonodos mesentéricos.	34
Figura 14. Contagem diferencial de células do lavado peritoneal.	35
Figura 15. Imunofenotipagem de células do peritônio.	36
Figura 16. Imunofenotipagem de células dos linfonodos drenantes.	37
Figura 17. Imunofenotipagem de células do baço.	38
Figura 18. Dosagem de citocinas do soro de animais sépticos.	39
Figura 19. Produção de Peróxido de Hidrogênio em células peritoneais.	40

RESUMO

A sepse é definida como uma síndrome em que há o desequilíbrio entre as respostas anti e pró-inflamatórias levando a efeitos sistêmicos. Com o intuito de descobrir alternativas eficientes para conter este quadro, estudos com produtos naturais são cada vez mais presentes na literatura. Neste contexto, tem-se a espécie vegetal *Punica granatum* L. conhecida como romã e que apresenta ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito anti-inflamatório que o Extrato Bruto de *Punica granatum* (EBPg) apresenta frente à sepse polimicrobiana letal induzida em camundongos. Para investigar o efeito do EBPg (5mg/Kg) foram utilizados 25 animais distribuídos em 5 grupos: CLP, ATB (tratado com Imipenem), CLP tratado 6 horas antes da indução de sepse, CLP tratado concomitante a sepse e CLP tratado 6 horas após a indução de sepse. A sobrevivência desses animais foi acompanhada por 5 dias a cada 12h. Verificou-se que o extrato teve efeito terapêutico e que os animais com tratamento concomitante à indução de sepse tiveram aproximadamente 65% de sobrevivência. Para avaliar os parâmetros celulares e imunológicos 15 animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM, CLP e CLP+EBPg. Após 12h da indução da sepse os animais foram eutanasiados. Inicialmente avaliou-se o percentual de leucócitos no sangue periférico, observando-se aumento no número de linfócitos e neutrófilos nos animais sépticos tratados, em relação aos animais não tratados. Avaliou-se o efeito do EBPg nos principais órgãos linfoides primários (medula) e secundários (linfonodo e baço) por meio de contagem total de células, bem como no foco infeccioso (peritônio) por meio de contagem total e diferencial e no pulmão, um dos principais órgãos acometidos na sepse, por meio de contagem diferencial de células do Lavado Bronco Alveolar (LBA). Observou-se que não houve diferença na quantidade de células presentes na medula, linfonodo e LBA entre os grupos tratado e não tratado. No entanto, houve menor quantidade de células no baço dos animais tratados quando comparados com animais não tratados e aumento de células na cavidade peritoneal. Dentre os tipos celulares encontrados no peritônio dos animais sépticos tratados ou não, os neutrófilos tiveram maior percentual. No entanto, o extrato promoveu o aumento tanto de macrófagos como de linfócitos no foco infeccioso. Com o intuito de investigar a eficiência das células em conter a proliferação de microrganismos no foco infeccioso avaliou-se a produção de peróxido de hidrogênio. O extrato promoveu a redução na MFI do grupo tratado e estimulado com PMA em relação ao grupo CLP e da porcentagem de H₂O₂ do grupo tratado em relação ao sham e ao CLP+EBPg, demonstrando que o EBPg mantém a produção de H₂O₂, porém não de maneira exacerbada. Para verificar quais os fenótipos celulares estavam presentes nos órgãos linfoides secundários (linfonodo e baço) e no foco infeccioso, realizou-se a técnica de imunofenotipagem. No linfonodo houve aumento do percentual de linfócitos e células dendríticas ativadas, e diminuição de linfócitos auxiliares ativados. No baço verificou-se aumento de ativação de células apresentadoras. Nas células do peritônio verificou-se aumento de linfócitos T helper ativados e diminuição de linfócitos T citotóxicos. Além disso, verificou-se as principais citocinas liberadas no soro dos animais. O EBPg promoveu o aumento da liberação de todas as citocinas dosadas (IL-6, IL-10, MCP-1, INF- γ , TNF) com um destaque especial para a IL-10. Dessa forma, podemos inferir que o EBPg possui potencial imunomodulador, agindo no controle de parâmetros inflamatórios como aumento da liberação de citocina regulatória, ativação de células imunológicas envolvidas na atividade reguladora e apresentação de antígenos, controle da produção de peróxido de hidrogênio e controle indireto da infecção, através do recrutamento de células para o foco infeccioso. Sendo assim, ele se apresenta como uma importante alternativa terapêutica em casos de sepse.

Palavras chave: Inflamação; Romã; Infecção; Imunomodulação.

ABSTRACT

Sepsis is defined as a syndrome in which there is an imbalance between anti and pro-inflammatory responses leading to systemic effects. With the aim of discovering efficient alternatives to contain this picture, studies with natural products are increasingly present in the literature. In this context, we have the plant species *Punica granatum* L. known as pomegranate and that has anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant action. In this way, the objective of this work was to evaluate the possible anti-inflammatory effect that the Hydroalcoholic Crude Extract of *Punica granatum* (HCEPg) presents against the lethal polymicrobial sepsis induced in mice. To investigate the effect of EBPg (5mg/kg), 25 animals were used in 5 groups: CLP, ATB (treated with Imipenem), CLP treated 6 hours before induction of sepsis, treated with concomitant sepsis and PLC treated 6 hours after the induction of sepsis. The survival of these animals was monitored for 5 days every 12 hours. It was verified that the extract had therapeutic effect and that the animals with treatment concomitant to the induction of sepsis had approximately 65% of survival. To evaluate the cellular and immunological parameters, 15 animals were distributed in 3 groups: SHAM, CLP and CLP+EBPg. After 12h of sepsis induction the animals were euthanized. The percentage of leukocytes in the peripheral blood was initially evaluated, with an increase in the number of lymphocytes and neutrophils in treated septic animals, compared to untreated animals. The effect of HCEPg on the major primary (bone marrow) and secondary lymphoid organs (lymph node and spleen) was evaluated by means of total cell count, as well as in the infectious (peritoneum) focus by means of total and differential count and in the lung, a of the main organs affected in sepsis, by means of differential counting of Broncho Alveolar Lavage (BAL) cells. It was observed that there was no difference in the amount of cells present in the bone marrow, lymph node and BAL between the treated and untreated groups. However, there were fewer cells in the spleens of treated animals compared to untreated animals and increased cells in the peritoneal cavity. Among the cell types found in the peritoneum of septic animals treated or not, neutrophils had a higher percentage. However, the extract promoted the increase of both macrophages and lymphocytes in the infectious focus. In order to investigate the efficiency of the cells in containing the proliferation of microorganisms in the infectious focus the production of hydrogen peroxide was evaluated. The extract promoted the reduction in MFI of the treated and stimulated group with PMA in relation to the CLP group and the percentage of H₂O₂ of the treated group in relation to sham and CLP+HCEPg, demonstrating that the HCEPg maintains H₂O₂ production, but not of exacerbated manner. To verify which cell phenotypes were present in the secondary lymphoid organs (lymph node and spleen) and the infectious focus, the immunophenotyping technique was performed. In the lymph node there was an increase in the percentage of activated lymphocytes and dendritic cells, and a decrease in activated lymphocytes activated. In the spleen there was an increase in the adduction of host cells. In cells of the peritoneum there was an increase in activated helper T lymphocytes and a decrease in cytotoxic T lymphocytes. In addition, the major cytokines released in the sera from the animals were found. HCEPg promoted increased clearance of all cytokines (IL-6, IL-10, MCP-1, INF- γ , TNF) with a special highlight for IL-10. Thus, we can infer that the HCEPg has immunomodulatory potential, acting in the control of inflammatory parameters such as increased release of regulatory cytokine, activation of immunological cells involved in regulatory activity and presentation of antigens, control of hydrogen peroxide production and indirect control of infection, by recruiting cells to the infectious focus. Thus, it presents itself as an important therapeutic alternative in cases of sepsis.

Keywords: Inflammation; Pomegranate; Infection; Immunomodulation

1 INTRODUÇÃO

A sepse está entre as maiores causas de admissão de pacientes nas UTIs, acontecendo especialmente em idosos e indivíduos imunossuprimidos (ESPOSITO et al., 2017). Ainda que com números subestimados, há relatos da alta incidência de sepse em todo o mundo, chegando com, aproximadamente, 288 e 148 casos de sepse e “sepse severa” (termo em desuso) a cada 100mil pessoas por ano. (FLEISCHMANN et al., 2016). Esses pacientes são submetidos a tratamento intensivo imediato devido à gravidade do caso, que pode rapidamente evoluir a óbito. Todo o arsenal terapêutico dispensado ao paciente séptico é imprescindível e extremamente oneroso. Ventilação mecânica, antibioticoterapia restrita, hidratação venosa, monitoramento ininterrupto e todos os recursos humanos disponíveis 24 horas geram um gasto milionário ao sistema de saúde. Mesmo com todo o suporte disponível, o índice de óbito devido à sepse ainda permanece elevado, alcançando números acima de 80% (SCHULTZ et al., 2017).

Diversas pesquisas são direcionadas para a descoberta de novos agentes terapêuticos na sepse. Dentre os possíveis agentes terapêuticos em avaliação clínica, destacam-se as trombomodulinas, imunoglobulinas, corticosteroides, vasopressores e enzimas endógenas (VINCENT, 2015). No entanto, é cada vez maior a busca por substâncias biologicamente ativas que apresentem potencial antimicrobiano e imunomodulador em distúrbios inflamatórios como a sepse. Nesse sentido, destacam-se os produtos naturais vegetais que são ricos em princípios ativos com atividade biológica.

O laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão vem, historicamente, desenvolvendo diversos trabalhos com o uso de produtos naturais em modelos de indução de sepse. Dentre os principais resultados estão os de Maciel et al., (2008), que mostraram que o tratamento com extrato das folhas de *Syzygium jambolanum* garantiu a sobrevida de camundongos sépticos, por induzir neutrofilia na cavidade peritoneal, aumentar a produção de peróxido de hidrogênio (microbicida) e reduzir TNF- α e do nitrito sérico; Souza et al., (2011) em que o tratamento terapêutico com mesocarpo de babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) induziu uma resposta imunológica eficaz frente à infecção bacteriana promovida pela sepse letal induzida pela inoculação de *S. aureus* e garantiu a sobrevida dos animais tratados; Maciel et al., (2014), no qual foi possível inferir que o tratamento com dose não letal (200 μ g/kg) do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* é capaz de melhorar a sobrevida e a inflamação pulmonar em camundongos com sepse induzida por CLP; Barroqueiro et al., (2016), que mostraram que o extrato do

mesocarpo de babaçu (*Attalea speciosa* syn *Orbignya phalerata* Mart) tem ação antimicrobiana *in vitro* e importante ação antisséptica *in vivo* devido às propriedades antimicrobiana e imunoduladora, garantindo a sobrevivência dos animais tratados. Por fim, Rios et al., (2017) demonstraram que o tratamento com extrato de folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. melhora a atividade fagocítica das células imunológicas e diminui o crescimento bacteriano e a resposta inflamatória sistêmica em camundongos com sepse induzida por ligadura e perfuração cecal.

Dentre as espécies vegetais com ampla diversidade de atividades biológicas destaca-se *Punica granatum* L.. Pertencente à família Punicaceae é popularmente chamada de romã, romeira ou granado, com grande distribuição territorial (OLIVEIRA et al., 2010). A prática empírica utiliza suas folhas, cascas de caule e frutos no tratamento de uma gama de infecções e processos inflamatórios diversos (JURENKA, 2008). Possui como constituintes grandes quantidades de polifenóis, como taninos e flavonoides, aos quais se pode atribuir atividade anti-inflamatória (LEE et al., 2010), antimicrobiana (AL-ZOREKY, 2009) e antioxidante (RICCI et al., 2006).

As principais atividades biológicas da *P. granatum* estão associadas aos compostos secundários encontrados em toda a sua extensão. Na casca do fruto, em especial, os principais componentes são compostos fenólicos como flavonoides (antocianinas e catequinas) e taninos (punicalina, pedunculagina, punicalagina) e estão fortemente relacionados à ação antioxidante (ISMAIL et al., 2012). Outros importantes componentes, como ácido gálico, ácido elágico e punicalagina, possuem atividade antibacteriana contra representantes da microbiota intestinal, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp contra *Vibrio cholerae* (PAI et al., 2011)

Trabalhos como os de Makled et al. (2016) indicam o efeito protetor de *P. granatum* contra o estresse oxidativo e inflamação em ratos sépticos por meio da inibição da via de TLR4/NF-kB. Além disso, Shapiro et al., (2009) revisaram e destacaram a participação dos polifenóis, um dos principais componentes do extrato de *P. granatum*, na prevenção e tratamento da sepse.

Frente a isso, este trabalho visa avaliar, o uso do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* em modelo experimental de sepse letal. Sabe-se que esse é um produto natural com efeito antimicrobiano por possuir taninos e flavonoides na sua constituição, e com atividade antisséptica e anti-inflamatória (LEE et al., 2010; JURENKA, 2008) características de grande importância em um quadro de sepse. Dessa forma, a hipótese testada foi: que o extrato

bruto hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* apresenta potencial ação imunomoduladora atuando na regulação da resposta inflamatória sistêmica em quadro de sepse letal polimicrobiana induzida em camundongos.

Os resultados deste trabalho geraram um artigo científico (em anexo) intitulado “*Punica granatum* L. decreases bacterial growth and systemic inflammatory response in sepsis induced by Cecal Ligation and Puncture” que foi submetido à revista “Frontiers in Microbiology” que publica artigos sobre descobertas notáveis em todo o espectro da Microbiologia. (ISSN: 1664-302X, fator de impacto: 4.076 e qualis A2 para a área de Medicina I).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sepses

2.1.1 *Perspectiva histórica da definição de sepsis*

O termo sepsis tem origem grega e era utilizado para expressar o conceito “decomposição de matéria orgânica de origem animal ou vegetal na presença de bactéria” (GEROULANOS et al., 2006). A primeira menção do termo foi encontrada em poemas de Homer onde sepsis deriva da forma verbal *sepo* com significado de “eu apodreço”. Além disso, outros pesquisadores como Hipócrates, Aristóteles, Plutarch e Galen também usaram o termo sepsis com o mesmo significado. Isso indica que essa terminologia persistiu por mais de 2.700 anos com poucas ou nenhuma mudança de significado (GEROULANOS et al., 2006).

Apesar do termo sepsis ser amplamente utilizado por longo período de tempo, a importância da resposta do hospedeiro à infecção foi primeiro descrita, classificada e separada em imunidade mediada por células ou humoral nos anos 1880 (SINGH et al, 2006). A resposta do hospedeiro na sepsis é de crucial importância porém, durante muitos anos permaneceu com grandes limitações em sua definição. Nesse contexto, foram realizadas 3 importantes reuniões, sendo a primeira em 1991, a segunda em 2001 a última em 2014, onde profissionais da área discutiram e elaboraram consensos acerca da definição e de maneiras para agilizar o diagnóstico e prevenir a sepsis, visando diminuir as altas taxas de mortalidade.

No primeiro consenso estabeleceu-se a SIRS como um processo inflamatório com consequências sistêmicas independente da causa (sem estar relacionada com infecção) (Figura 1). Tem como critérios a presença de dois ou mais dos seguintes sintomas: temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C; frequência cardíaca maior que 90 bpm; taquipneia, medida por uma frequência respiratória maior que 20 rpm ou hiperventilação, identificada por uma PaCO₂ menor que 32 mmHg; alterações na contagem de leucócitos numa faixa de mais de 12.000 cél./mm³ ou menos de 4.000 cel/mm³ ou presença de mais de 10% de neutrófilos imaturos. As principais causas da SIRS são representadas por pancreatites, isquemia, injúria tecidual, traumas, choque hemorrágico e injúria orgânica mediada pela imunidade. Recomendou-se que, quando a SIRS for causada por uma infecção confirmada o termo certo a ser utilizado é sepsis (BONE et al., 1992).

O primeiro consenso destacou que o desenvolvimento da sepsis é caracterizado por um processo contínuo de severidade da síndrome, podendo evoluir de sepsis para sepsis severa, se-

pse induzida por hipotensão e chegar ao choque séptico, estágio mais grave. A sepse severa era apresentada como uma condição onde havia associação com disfunção orgânica e hipoperfusão. A sepse induzida por hipotensão ocorria quando havia presença de pressão sistólica menor que 90 mmHg ou redução para 40 mmHg na ausência de outras causas de hipotensão. O choque séptico, por sua vez, era definido como uma subdivisão da sepse severa e ocorria quando havia sepse induzida por hipotensão persistente mesmo após a administração do líquido de ressuscitação juntamente com a presença de anormalidades de hiperperfusão ou disfunção orgânica. Os autores destacam também que o termo *síndrome séptica* não deveria ser utilizado por gerar confusão e ambiguidade em sua definição (BONE et al., 1992).

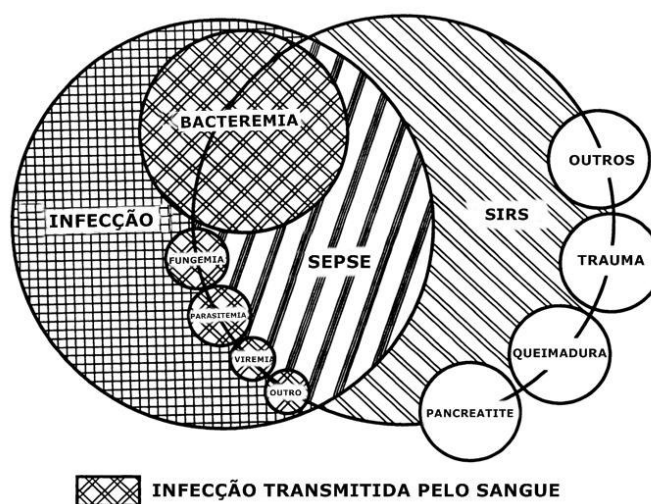


Figura 1. Inter-relação entre Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), sepse e infecção estabelecido no primeiro consenso de sepse. A sepse passa a ser definida como o processo que ocorre quando há pelo menos um dos sinais da SIRS e necessariamente a presença de um patógeno causador da infecção no sangue. Enquanto que a SIRS é o processo causado por outros fatores não ligados à presença de um patógeno. Fonte: adaptado de BONE et al., 1992.

Levy et al (2003) destacam que mesmo após a publicação das definições e consensos sobre a terminologia envolvida na sepse, muitos clínicos relatavam que a definição ainda não era clara o suficiente e que cerca de 71% dos profissionais de saúde indagados não respondiam uma definição de sepse que fosse comum a todos. Dessa forma, percebeu-se a necessidade de atualização desse termo e, portanto, as sociedades envolvidas elaboraram o segundo consenso de sepse 10 anos depois do primeiro.

Com relação à sepse, o segundo consenso frisa a importância de estabelecer critérios que ajudem a identificar a síndrome o mais prontamente possível, a fim de agilizar o tratamento e diminuir significativamente o número de óbitos. Dessa forma, os pesquisadores apontaram que os

critérios de sepse devem ser úteis tanto para clínicos, que cuidam nos pacientes diretamente nos leitos, sendo sensíveis para identificar a maioria dos pacientes, aplicáveis tanto a adultos quanto a pacientes pediátricos e neonatais; quanto para os pesquisadores que estudam a síndrome em laboratório (LEVY et al., 2003).

As definições de sepse severa, estágio mais grave da sepse quando há presença de disfunção orgânica; e de choque séptico, estado de insuficiência circulatória aguda caracterizada por hipotensão arterial persistente e não explicada por outras causas; bem como a definição de disfunção orgânica permaneceram sem alterações em comparação com o consenso de 1992.

O segundo consenso de sepse não apresenta nenhuma nova definição delimitada de sepse ou de terminologias associadas à síndrome, pois os estudiosos envolvidos alegaram a falta de evidências que dessem suporte a novas definições. No entanto, realiza diversas considerações baseadas em observações da realidade e discussões que serão pertinentes para a realização do terceiro consenso, 13 anos depois.

Um dos maiores problemas relatados na sepse é a dificuldade de estabelecer critérios clínicos padronizados e característicos que sejam eficazes no pronto reconhecimento do paciente séptico. Isso implica em maior dificuldade de desenvolvimento de estudos epidemiológicos devido à falta de consenso entre as formas e critérios de diagnósticos globais para a síndrome. Esse fato gera uma grande variação na incidência e na taxa de mortalidade relatadas para a sepse. Portanto, um dos interesses do terceiro consenso de sepse foi definir critérios e características com o objetivo de trazer uniformidade e sanar esse desafio. Esses critérios devem identificar todos os elementos da sepse (infecção, resposta do hospedeiro e disfunção orgânica), serem fáceis de obter, estarem prontamente disponíveis e terem um custo razoável (SINGER et al., 2016).

Anteriormente a sepse era definida por 2 ou mais critérios da SIRS com a presença de um agente infeccioso. O novo consenso admite que a sepse envolve ambas as resposta inflamatória e anti-inflamatórias do hospedeiro juntamente de outros fatores não imunológicos como: cardiovascular, neuronal, hormonal, bioenergética, metabólica e de coagulação. Portanto, a partir do terceiro consenso é adotada uma nova definição de sepse: disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta de hospedeiro desregulada à infecção. Essa nova definição abrange características importantes da sepse como a desregulação da homeostase, causada pela resposta do hospedeiro à infecção, a potencial letalidade da síndrome e a necessidade do seu pronto reconhecimento (SINGER et al., 2016).

Além disso, é destacado que o critério de 2 ou mais sintomas da SIRS é ineficaz, uma vez que a SIRS dá indícios de inflamação e que esses sinais estão presentes em muitos tipos de pacientes, incluindo aqueles que não são acometidos de infecção. Por outro lado, há pacientes apresentando infecção e com diagnóstico de falência de órgão que não apresentam o mínimo de 2 sinais da SIRS, o que demonstra a sua ineficiência no diagnóstico de sepse (SINGER et al., 2016).

Assim como no conceito de sepse o diagnóstico de falência de órgãos apresenta inconsistência, o que leva a uma grande variedade de resultados. O comprometimento da função orgânica é avaliado pela aplicação de diversos sistemas de pontuação, o que pode ser uma das causas da inconsistência de resultados e dificuldade de interpretação dos mesmos. O sistema de pontuação predominantemente usado é o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) (Tabela 1) onde uma maior pontuação está relacionada com o aumento da probabilidade de morte. No entanto, o SOFA não é bem reconhecido fora da Unidade de Tratamento Intensivo, o que prejudica a detecção precoce de fatores de risco para a falência de algum órgão vital (SINGER et al., 2016).

Tabela 1. Critérios e respectivas pontuações para o SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). O SOFA avalia parâmetros como respiração, coagulação, fígado, função cardiovascular, sistema nervoso central e rins. Para cada parâmetro são dispostos critérios e sinais que são atribuídos de uma determinada pontuação que varia de 0 a 4. Quanto maior for a pontuação do paciente no SOFA, maior será a probabilidade de morte. Fonte: adaptado de SINGER et al., 2016.

Pontuação sequencial de avaliação de falha de órgão [sepse] ^a					
Sistema	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Respiração					
PaO ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) com suporte respiratório	<100 (13.3) com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Fígado					
Bilirubina, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	PAM ≥70 mm Hg	PAM <70 mm Hg	Dopamina <5 or Dobutamina (qualquer dose) ^b	Dopamina 5.1-15 ou epinefrina ≤0.1 ou norepinefrina ≤0.1 ^b	Dopamina >15 or epinefrina >0.1 ou norepinefrina >0.1 ^b
Sistema nervoso central					
Pontuação escala Glasgow Coma ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Saída de urina, mL/d				<500	<200

Abreviações: Fio₂, fração inspiração de oxigênio, PAM: pressão arterial média
PaO₂ pressão parcial de oxigênio

^a Adaptado de Vincent et al.²⁷

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

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

O terceiro consenso de sepse (Sepse-3) delimita também uma nova definição para choque séptico: um subconjunto da sepse em que as anormalidades consequentes do metabolismo circulatório e celular são profundas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade. Assim, foram elaborados novos critérios clínicos para definir o quadro de choque séptico, envolvendo parâmetros como hipotensão, necessidade de terapia vasopressora, níveis de lactato e fluido de ressuscitação adequados (SINGER et al., 2016).

O Sepse-3 além de dar maior enfoque ao SOFA traz para discussão a utilização de mais um elemento com intuito de acelerar o reconhecimento de um paciente séptico: o quick SOFA (qSOFA). Essa ferramenta é diferente do SOFA tanto em função quanto em parâmetros avaliados. O qSOFA é utilizado fora da UTI, ou seja, à beira leito, de forma a detectar com maior rapidez os principais sinais que indicam pacientes com graves complicações e que tendem a ter um mau prognóstico. No qSOFA são avaliados parâmetros como taxa respiratória, alteração mental e pressão sanguínea (SINGER et al., 2016).

Além dos três consensos de sepse, em 2002 criou-se a *Surviving Sepsis Campaign* que é uma colaboração conjunta da “Society of Critical Care Medicine” e da “Sociedade Europeia de Medicina Intensiva”, comprometidas com a redução da mortalidade e da morbidade por sepse e choque séptico em todo o mundo (RHODES et al., 2017). Essa campanha é responsável pela delimitação de diretrizes para o diagnóstico e tratamento da sepse, sendo essencial nos estudos epidemiológicos.

2.1.2 Epidemiologia da Sepse

Um dos principais desafios dos estudos epidemiológicos de sepse estava, primeiramente, na dificuldade de padronização do conceito e, portanto, na possibilidade de subnotificação devido à associação do óbito à patologia consequente da sepse e não à sepse propriamente dita. Esse e outros fatores, como a discrepância entre notificação de casos de sepse em países desenvolvidos e país não desenvolvidos e entre hospitais da rede pública e privada, impedem o acesso ao real número de casos de sepse no mundo (ILAS, 2016).

Martin e colaboradores realizaram, em 2003, um importante estudo epidemiológico da sepse nos EUA abrangendo os anos entre 1979 e 2000, por meio de acesso ao banco de dados do *National Hospital Discharge Survey*. Cerca de 750 milhões de pacientes foram analisados e os pacientes sépticos foram identificados com base na Classificação Internacional de Doenças, Nona Revisão, Modificações Clínicas. De forma geral, mais de 10 milhões de casos de pacientes com

sepsse foram identificados. Nesse período, ocorreu um aumento na incidência de sepsse de 8,7% ao ano.

Padkin e colaboradores (2003) usaram um banco de dados compilado na Inglaterra, País de Gales e Irlanda do Norte para determinar a incidência de sepsse nesses países. Cerca de 39% das UTIs desses países foram avaliadas com dados das primeiras 24 horas dos pacientes após a admissão. No geral, 27,1% das admissões (de adultos) tiveram sepsse nas primeiras 24 horas. Em estimativa para os países da Inglaterra e País de Gales, a taxa de incidência anual para sepsse grave foi determinada em 51 casos por 100.000 habitantes.

Embora haja aumento da sua incidência, a letalidade em casos de sepsse diminuiu, nos últimos anos devido, dentre outros fatores, aos avanços no suporte e cuidados aos doentes graves (ZIMMERMAN et al., 2013). Como por exemplo, a implementação da *Surviving Sepsis Campaign* (DELLINGER et al., 2013, RHODES et al., 2017) que abrange uma série de informações e diretrizes para o tratamento de pacientes sépticos. Entretanto, os registros de letalidade em publicações epidemiológicas mostram um cenário bastante diverso, com importantes diferenças entre países desenvolvidos e países com poucos recursos.

No Brasil, os dados epidemiológicos de sepsse são escassos e antigos. Os três principais estudos multicêntricos são: o BASES, realizado em cinco UTIs em 2002 que mostrou a letalidade por sepsse e choque séptico em torno de 47,3% e 52,2%, respectivamente (SILVA et al., 2004); o Sepsse Brasil, que ocorreu em 2003 e abrangeu cerca de 75 UTIs de dezessete estados e mostrou que, em média, 17% dos leitos nessas unidades são ocupados por pacientes sépticos, com letalidade de 34,4% e 65,3% por sepsse e choque séptico, respectivamente (SALES et al., 2006); por fim, o COSTS, que, entre 2003 e 2004, analisou 21 UTIs mostrando que há maior letalidade de pacientes sépticos em hospitais da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) em relação aos hospitais ligados ao Sistema de Saúde Suplementar (SOGAYAR et al., 2008).

Sabe-se que, quanto mais grave o quadro clínico maior é a taxa de letalidade e que o foco infeccioso está intimamente relacionado com a gravidade do processo séptico (ILAS, 2016; MAYR et al., 2014). Estudos sobre os tipos de microrganismos causadores da sepsse têm evoluído ao longo dos anos. Originalmente, a sepsse foi descrita como uma patologia relacionada às bactérias Gram-positivas, pois era considerada uma resposta a endotoxinas. Entretanto, pesquisas epidemiológicas mais recentes divulgaram que nos últimos 25 anos, as bactérias Gram-negativas

tem sido a causa mais comum da sepse. Atualmente é descrito na literatura que esta síndrome é causada por qualquer tipo de antígeno bacteriano, fúngico ou viral (MARTIN, 2012).

Dermengiu e colaboradores (2013), em análises forenses, indicam que as principais infecções associadas à morte por sepse são de origem pulmonar, cutânea e urinária. Eles também destacam que em 77% dos casos, o principal agente etiológico são bactérias Gram-negativas (com maioria de microrganismos multirresistentes) seguidas de Gram-positivas (13%), fungos (5%), anaeróbios (2%), e outros (3%).

A sepse está entre as síndromes com maiores custos hospitalares, atingindo o montante de mais de 20 milhões de dólares em hospitais dos Estados Unidos (TORIO e ANDREWS, 2013). No Brasil esses gastos chegam a 1.028 dólares diários, sendo o custo de pacientes não sobreviventes ainda mais elevado (SOGAYAR et al., 2008). Entender com maior profundidade a fisiopatologia se faz importante para a pronta identificação do paciente séptico, bem como na escolha do tratamento adequado e, conseqüente, melhora do quadro clínico.

2.1.3 Aspectos imunofisiológicos da sepse

Atualmente a sepse é definida como uma disfunção orgânica com elevado risco de morte causada por uma resposta do hospedeiro desregulada à infecção (SINGER et al., 2016), destacando a importância do agente infeccioso nesse processo. A resposta do hospedeiro a uma infecção abrange etapas, diversos fatores e componentes do sistema imunológico. Os Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP) são os componentes iniciadores da resposta imune, uma vez que reconhecem sinais de perigo, como a entrada de patógenos (KAWAI e AKIRA, 2010).

Os RRP são responsáveis por reconhecerem sinais exógenos como Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs), como lipopolissacarídeo (LPS, presente em bactérias gram-negativas), peptidoglicano, lipopeptídeos, ácido lipoteicóico (componente da parede celular de bactérias Gram-positivas), flagelina, DNA bacteriano e componentes fúngicos (KAWAI e AKIRA, 2010). Além disso, eles também reconhecem sinais endógenos como Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), que são liberados durante processos de estresse inflamatório e injúrias como queimaduras, traumas e necrose tecidual, por exemplo (CHAN et al., 2012).

Uma das mais importantes famílias de RRP é a do tipo Toll-like (TLRs), que podem ser expressos na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) ou intracelularmente (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9). A localização celular dos TLRs é considerada

importante para a acessibilidade do seu ligante (WIERSINGA et al., 2014). Segundo Tsujimoto e colaboradores (2008), camundongos com sepse induzida por Ligadura e Perfuração Cecal (CLP) apresentam aumento significativo da expressão de TLR4 em células do Lavado Bronco Aalveolar (LBA) e em macrófagos do fígado e do baço, em comparação com grupo sham.

Uma vez que o agente infeccioso é reconhecido, as células residentes iniciam a resposta inflamatória. Quando um número limitado de patógenos invade, as respostas locais são suficientes para o controle da proliferação desses microrganismos. Fagócitos residentes englobam esses agentes e produzem uma gama de citocinas pró-inflamatórias, que iniciam a resposta do sistema imune inato (BENOIT et al., 2008).

Uma das principais células fagocíticas é o neutrófilo, caracterizado pela elevada presença de grânulos. A fusão dos grânulos de neutrófilos com as bactérias cria um ambiente hostil, com pH baixo e proteases potentes que apresentam grande capacidade de destruição do patógeno. No entanto, existem outros mecanismos, incluindo a morte dependente de oxigênio, em que os neutrófilos geram uma explosão respiratória por meio da produção reativos de oxigênio, como o ânion superóxido e os radicais hidroxila (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

O recrutamento celular para o foco infeccioso é extremamente importante para o controle local de crescimento bacteriano e, conseqüentemente, para a prevenção da disseminação bacteriana (BENJAMIM et al., 2000, 2002; ALVES-FILHO et al., 2005). Durante o processo infeccioso, o número de neutrófilos aumenta próximo às vênulas pós-capilares, eles atravessam a barreira endotelial por diapedese e atingem a área de infecção. Dessa forma, são capazes de ampliar a resposta inflamatória, eliminando os microrganismos pela liberação de agentes bactericidas, tais como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

As ERO são produzidas no interior de fagossomos por reações iniciadas pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase, que produz formas ativas de oxigênio incluindo os radicais ânion superóxido e peróxidos de hidrogênio, fundamentais na eliminação de bactérias fagocitadas (KOBAYASHI e DELEO, 2009; MILLER e CHO, 2011). No entanto, elevadas taxas de ERO durante a sepse podem gerar danos no DNA que ativam enzimas de reparo. Essas enzimas, por sua vez, são fortes consumidoras de ATP e geram a depleção dessa fonte de energia, especialmente nas mitocôndrias, comprometendo a homeostase. Portanto, como mostrado na figura 2, o bloqueio dessa enzima pode ser uma terapia alvo interessante, pois assim haveria a

inibição da ativação da PARP e, portanto, melhor recuperação da homeostase (MATHEWS e BERK, 2008).

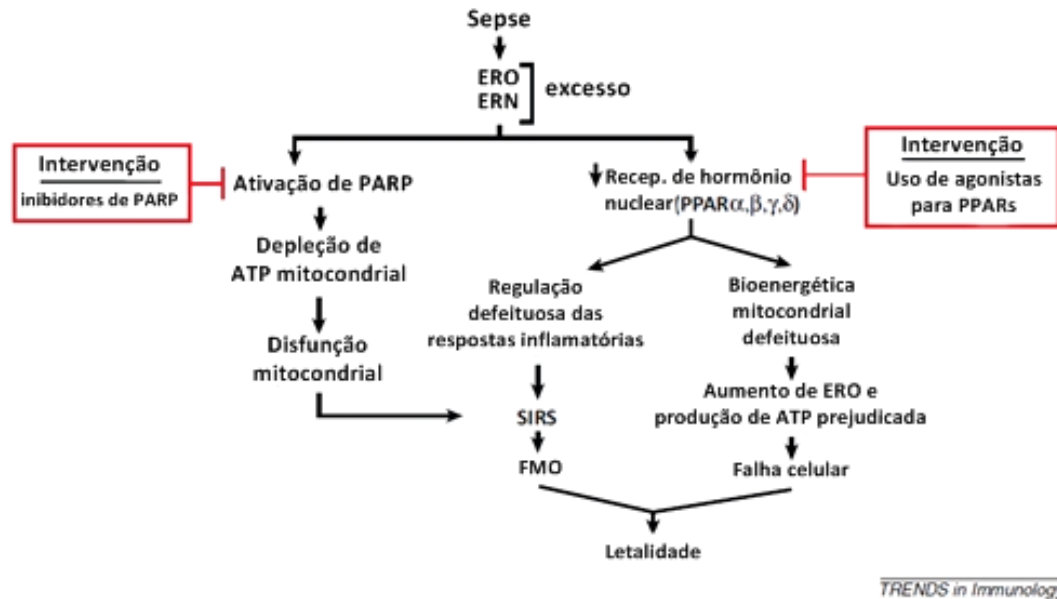


Figura 2. Consequências dos altos níveis de ERO e ERN na sepse. A sepse causa níveis reduzidos de PPARs acompanhados de função mitocondrial defeituosa, bem como reduções na ATP mitocondrial e reduzida capacidade de restringir as respostas inflamatórias, como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS). A sepse e as espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio reativo (ERN) também desencadeiam quebras de DNA de uma única cadeia, o que resulta na ativação da poli ADP-ribose polimerase (PARP) para o reparo do DNA. No processo, a depleção de níveis de NAD^+ pode ocorrer, acompanhada por reduções no ATP celular e mitocondrial. Fonte: adaptado de BOSMANN e WARD, 2013.

Além dos neutrófilos, as células apresentadoras de antígenos (APCs) e os linfócitos desempenham papel fundamental na resposta inflamatória desencadeada pelo reconhecimento de patógenos. O antígeno microbiano é apresentado às células T pelas APCs, em conjunto com outras proteínas da superfície celular, como moléculas coestimuladoras, que realizam a intermediação entre as células. Ocorrida a apresentação do antígeno, e quando os devidos sinais são recebidos, as células T CD4^+ efectoras secretam citocinas, como o interferon $\text{IFN-}\gamma$, que ativam as células fagocíticas para eliminarem as bactérias intracelulares e interagem com as células B, que então produzem anticorpos antimicrobianos. As principais moléculas coestimuladoras que medeiam esse processo são representantes da família B7: CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) que funcionam como ligantes para os receptores CD28/CTLA-4 nos linfócitos T (Figura 3) (STEARNs-KUROSAWA et al., 2011).

Em camundongos submetidos à CLP, a expressão de CD80 está aumentada nos macrófagos peritoneais, esplênicos e em monócitos do sangue periférico. Por outro lado, o CD86 é regulado negativamente no peritônio, enquanto sua expressão aumenta no baço e no sangue

periférico (NOLAN et al., 2008). Isso demonstra que a expressão de CD80 e CD86 pode servir para diferentes funções dependendo da localização das APCs e do local da infecção (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

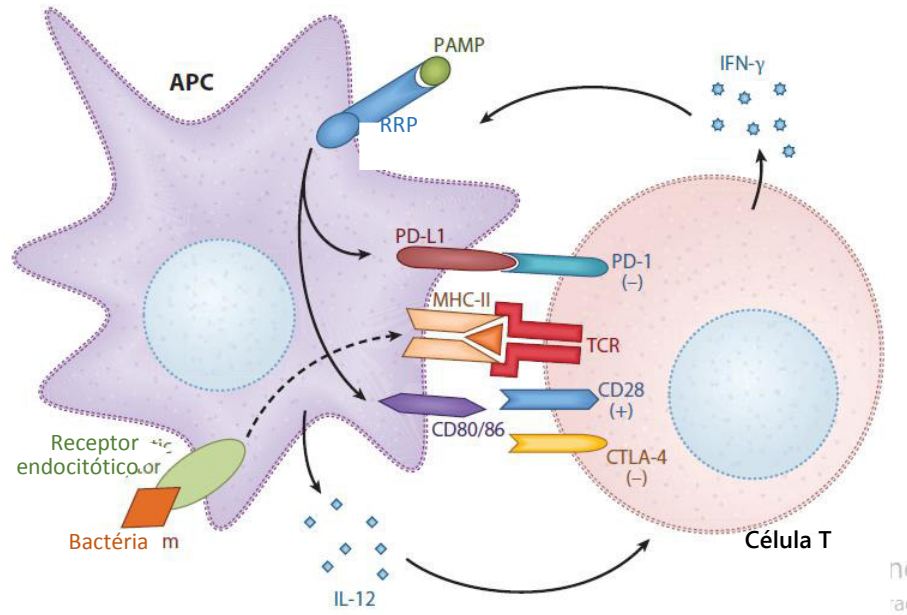


Figura 3. Interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T. As Células apresentadoras de antígenos (APCs) detectam a infecção através da ligação dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) aos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs). A interleucina (IL)-12 é então liberada e a expressão das moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e PD-L1) é regulada positivamente. Estas moléculas ligam-se aos seus ligantes de células T correspondentes, desde que o segundo sinal seja apresentado como antígeno pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC)-II. O CD80/86 liga-se ao CD28, resultando na ativação e proliferação de células T, e a interação PD-L1: PD-1 leva à anergia e apoptose de células T. O interferon (IFN)- γ é liberado pela ativação das células T como sinal para as células fagocíticas destruírem as bactérias intracelulares. Fonte: adaptado de (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

As citocinas e quimiocinas liberadas neste estágio aumentam o recrutamento e ativação de células imunológicas (YAMASHIRO et al., 2001). No contexto da sepse, inicialmente, a produção de citocinas pró-inflamatórias é ainda mais elevada (BURKOVSKIY et al., 2013). Citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral - alfa), IL-1 (interleucina 1), IL-6, IFN- γ e IL-12, estão entre as citocinas mais estudadas no quadro de sepse. Entretanto, a resposta pró-inflamatória exacerbada é contrabalanceada por citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10, TGF (fator de crescimento transformador) e IL-4, que tentam restaurar o equilíbrio imunológico (SCHULTE et al., 2013).

A primeira citocina que apresenta aumento de produção é o TNF- α , sendo liberado por macrófagos ativados aproximadamente 30 min após o início do reconhecimento antígeno (SCHULTE et al., 2013). As citocinas TNF- α e a IL-1 atuam em conjunto para induzir um estado

de choque caracterizado por permeabilidade vascular, edema pulmonar grave e hemorragia. A infusão de TNF- α recombinante em humanos resulta em SIRS com febre, anormalidade hemodinâmica, leucopenia, elevação das enzimas hepáticas e coagulopatia (JAFFER et al., 2010).

Em resposta à estimulação com LPS, IL-1 e TNF- α uma ampla variedade de células como macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas produzem IL-6. Concentrações elevadas dessa citocina são encontradas em condições agudas, como queimaduras, cirurgias e sepse (NIJSTEN et al., 1991). Ela também está relacionada à indução da febre e à mediação da resposta de fase aguda. Em reação sistêmica a um estímulo inflamatório a ação da IL-6 se caracteriza por febre, leucocitose e liberação de substância hepática aguda, proteínas de fase aguda, tais como proteína C-reativa, componentes do complemento, fibrinogênio e ferritina (SCHULTE et al., 2013). Além de propriedades pró-inflamatórias, a IL-6 também promove respostas anti-inflamatórias inibindo a liberação de TNF- α e IL-1 e aumentando os níveis circulatórios de mediadores anti-inflamatórios, como IL-1Ra, IL-10, TGF- β e cortisol (STEENSBERG et al., 2003).

Como mecanismo de manutenção da homeostase, após a fase de intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, as células inunes são então ativadas para produção de citocinas anti-inflamatórias. Uma das citocinas mais importantes nessa fase é a IL-10, produzida por macrófagos ativos, células T e células B (MOSSER e XIA, 2008). Experimentos em camundongos mostraram que o bloqueio ou neutralização de IL-10 leva a níveis aumentados de TNF e IL-6; ao contrário, a IL-10 exógena melhora a sobrevivência e reduz os níveis de citocinas inflamatórias como, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) (DUQUE e DESCOTEAUX, 2014).

A evolução da sepse pode resultar em falência múltipla dos órgãos, coagulação intravascular disseminada (DIC), síndrome do desconforto respiratório agudo e morte (RIEDMANN et al., 2003; RUSSEL, 2006; ANGUS e VAN DER POLL, 2013). Além disso, a sepse leva a imunossupressão e prejuízos na fagocitose por meio de deficiência ou esgotamento das principais células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas. Ela também causa a apoptose de células T e B e a expressão de ligantes e receptores inibitórios. No entanto, a intervenção com IL-7 é um importante alvo terapêutico, pois atua promovendo a proliferação das

células T e B e reverte a imunossupressão, como mostrado na figura 4 (UNSINGER et al., 2010; BOSMANN e WARD, 2013).

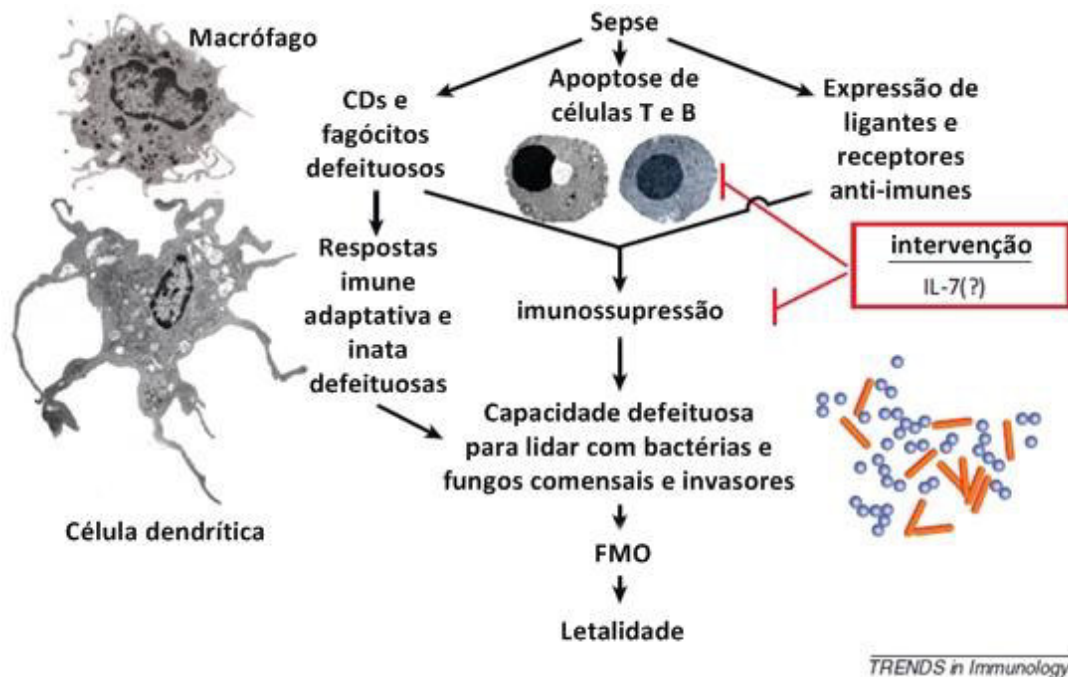


Figura 4. Efeitos da sepse no sistema imunológico e possível terapia alvo com a utilização de interleucina 7 (IL-7). A sepse leva à imunossupressão e fagocitose defeituosa, causada por depleção ou deficiências funcionais em macrófagos e células dendríticas, apoptose de células T e B e expressão de tecidos de ligantes e receptores inibitórios que suprimem as respostas imunes, principalmente por direcionamento de células T. Imunossupressão e função de fagócitos defeituosos leva à falha na contenção de bactérias e fungos comensais e invasores. O imunoestimulante interleucina IL-7, que promove a proliferação de células T e B e que tem efeitos anti-apoptóticos, pode ser um candidato para ensaios clínicos em seres humanos para reverter a imunossupressão da sepse. CD, célula dendríticas. FMO, falência múltipla de órgãos. Fonte: adaptado de BOSMANN e WARD, 2013.

Apesar da vasta quantidade de informações já existente na literatura acerca da sepse e de seu quadro clínico, essa síndrome apresenta uma fisiopatologia com elevado grau de complexidade. Dessa maneira, ainda se fazem necessários estudos clínicos e experimentais que auxiliem e direcionem as pesquisas e novas formas de terapias.

2.1.4 Modelos experimentais de sepse

Uma importante forma de avançar no campo da pesquisa é com experimentos *in vivo*, onde são utilizados diversos modelos de indução de sepse. Eles podem ser divididos em três tipos, de acordo com o agente iniciador: administração exógena de uma toxina, administração exógena de um patógeno viável ou alteração da barreira protetora endógena do animal. Os modelos de administração de toxinas utilizam subunidades como lipopolissacarídeos,

endotoxinas ou zymosan; os modelos de inoculação de patógeno fazem uso de soluções bacterianas ou fúngicas e os modelos de alteração de barreira podem ser representados pelos modelos de CASP (Colon Ascendens Stent Peritonitis) que consiste no implante de um *stent* no cólon ascendente de animais, permitindo o constante vazamento do conteúdo fecal na cavidade peritoneal e pelo modelo de CLP (Cecal Ligation and Puncture), que consiste na perfuração do ceco e extravasamento do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal (figura 5). Dentre os modelos citados, o de CLP é aquele que mais se assemelha com o modelo de sepse ocorrida em humanos, considerado padrão-ouro e por isso é o mais escolhido em pesquisas laboratoriais. Além disso, a apoptose de tipos celulares e as respostas imunes do hospedeiro parecem imitar o desenvolvimento da doença humana, adicionando mais validade clínica a este modelo (BURAS et al., 2005).

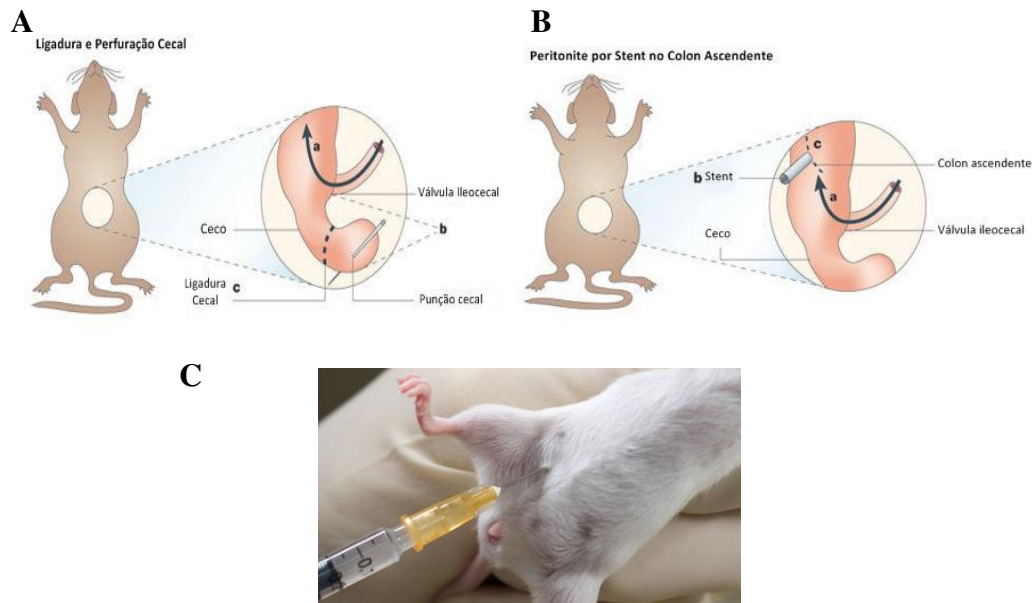


Figura 5. Modelos experimentais de sepse: (A) Ligadura e Perfuração Cecal (CLP) e (B) Peritonite por Stent no Colon Ascendente (CASP) São os dois modelos de indução de sepse mais utilizados e que garantem maior semelhança com os tipos de sepse que acontecem normalmente em humanos. Fonte: adaptado de BURAS et al., 2005 (C) Exemplo de administração exógena por via intraperitoneal. Esse tipo de administração também pode ser feita por via intravenosa. Fonte: <http://www.procedureswithcare.org.uk/intraperitoneal-injection-in-the-mouse>

O modelo de ligadura e perfuração cecal proporciona um extravasamento de conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, estabelecendo uma infecção polimicrobiana, ou seja, com as diversas espécies de microrganismos presentes na microbiota intestinal, sendo esta a fonte da inflamação. A severidade do quadro clínico pode ser alterada de acordo com o calibre da agulha usada nas perfurações, ou pelo número de perfurações, podendo chegar à sepse letal (WICHTERMAN et al., 1980; BURAS et al., 2005).

2.1.5 *Antimicrobianos e a sepse.*

A sepse é desafio tanto para cientistas quanto para profissionais clínicos, pois seu quadro mais complexo como choque séptico, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados e em indivíduos imunossuprimidos (MCPHERSON et al., 2013; MAYR et al., 2014). Habitualmente, os pacientes são tratados com antimicrobianos que podem causar alterações cardiovasculares, com efeitos colaterais graves (RAY et al., 2012) além de aumentarem a inflamação por meio da liberação de endotoxinas bacterianas e a injúria renal aguda (PENG et al., 2012).

A primeira observação de que tratamento realizado com antimicrobianos poderia ter efeitos imediatos e adversos nos pacientes foi feita de forma independente por Jarisch e Herxheimer. Eles observaram um aumento da temperatura corporal e diminuição na pressão arterial em pacientes acometidos de sífilis que foram tratados com drogas que atuavam na bactéria causadora da doença. Este efeito, é hoje conhecido como a reação de Jarisch-Herxheimer (JHR) (LEPPER et al., 2002).

Na década de 1980, por meio do ensaio de Lisado de Amebócitos Limulus (LAL), um ensaio para detecção de liberação de endotoxinas, foi possível demonstrar que os antibióticos podem desempenhar um papel importante na liberação de componentes da parede celular de bactérias Gram-negativas. A endotoxina pode ser liberada espontaneamente durante a multiplicação dos microorganismos, no entanto, sua liberação mostrou-se ser precipitada e intensificada pela desintegração induzida por antibióticos, tendo implicações no quadro clínico apresentado pelo paciente (LEPPER et al., 2002).

Estudos como os de Vianna et al., (2004) evidenciam, em experimentos com modelos animais sépticos, a influência de antibióticos na liberação de endotoxinas e citocinas. Nesse trabalho foram detectados maiores níveis de TNF- α e IL-6, tanto no plasma quanto no fluido da cavidade peritoneal, em animais não tratados. A administração de antibióticos de uso comum no tratamento de sepse (Imipenem e Ciprofloxacina mais clindamicina) os elevados níveis de TNF- α e IL-6 no plasma e no peritônio. Entretanto, verificaram também que o uso desses antibióticos aumentou a liberação de endotoxinas. Essas endotoxinas são potentes indutores de resposta pró-inflamatória em indivíduos que sofrem de sepse causada por bactérias Gram-negativas (LEPPER et al., 2002).

Clinicamente, a linearidade do desenvolvimento do quadro séptico não se faz presente. O agravamento da síndrome se faz de forma muito rápida, não havendo uma resposta terapêutica adequada, pois ainda que o paciente tenha a carga bacteriana controlada, permanece imunologicamente comprometido. Além disso, pacientes sépticos acarretam alto custo para os hospitais uma vez que necessitam de acompanhamento e atenção específicos, contemplando desde monitoramento e administração de medicamentos de custo elevado como também oxigenação, ventilação mecânica, suporte nutricional, dentre outros (MAYR et al., 2014). Assim, faz-se necessária a busca de uma nova estratégia de tratamento para esses pacientes.

2.2 Espécie Vegetal

2.2.1 Punica granatum L.

Atualmente, busca-se uma classe de medicamentos que atue de forma imunomodulatória e controle a inflamação exacerbada que ocorre durante a sepse (MACIEL et al., 2008; MACIEL et al., 2014). Neste contexto destacam-se os produtos naturais que apresentam grande potencial para pesquisas, uma vez que os mesmos podem ser ricos em metabólitos secundários com atividade farmacológica capaz de inibir a proliferação microbiana. (GYAWALI e IBRAHIM, 2014; AL-ZOREKY, 2009).

Dentre as espécies vegetais pode-se destacar *Punica granatum* L. que é pertencente à família Punicaceae popularmente chamada de romã, romeira ou granado. É fruto da romãzeira, tem sua origem na Ásia, porém está amplamente distribuída pelo território brasileiro (JURENKA, 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

Punica granatum é uma espécie vegetal conhecida milenarmente, sendo historicamente mencionada em livros como Bíblia Sagrada, Torá Judaica e Talmude Babilônico como referência a poderes de fertilização, abundância e boa sorte. É nativa do Himalaia, no norte da Índia ao Iran, porém é comumente cultivada na região do mediterrâneo, tendo como uma das principais características um período de vida extremamente longo, chegando a mais de 100 anos. Apresenta galhos espinhosos, flores grandes, de cor vermelha, branca ou coloração mesclada entre as duas. De forma geral, essa espécie vegetal apresenta casca que, com o passar dos anos, passa a apresentar coloração cinza, de acordo com a idade da planta. Possui cálice tubular de onde o fruto é originado, sendo que este pode ter até cinco centímetros de largura com uma pele vermelha, coriácea, em forma de granada e coroada pelo cálice apontado (JURENKA, 2008). O fruto apresenta grande quantidade de sementes separadas por uma membrana esbranquiçada do

pericarpo e cada semente é envolvida por uma polpa vermelha, de onde é extraído o suco (figura 6).

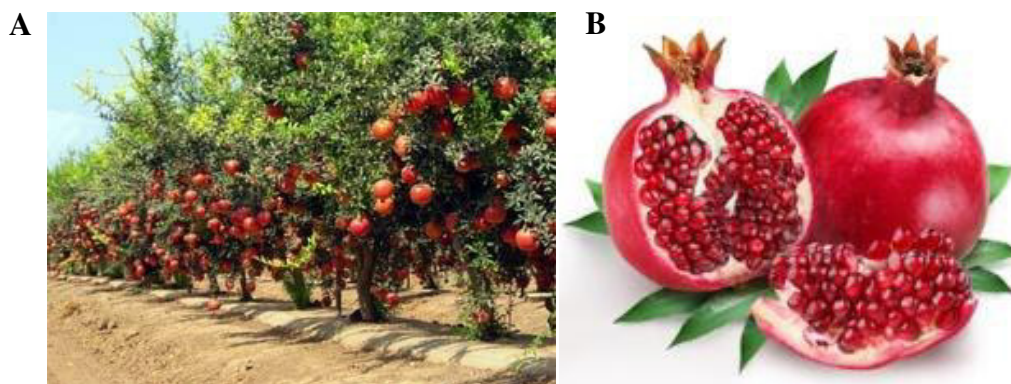


Figura 6. Aspectos morfológicos da espécie vegetal *Punica granatum*. A) Partes aéreas da romãzeira. B) Fruto de romã evidenciado a casca e as sementes. Fonte: Google imagens

A prática empírica utiliza suas folhas, cascas de caule e frutos sendo aplicadas no tratamento de infecções de garganta, rouquidão, febre, em processos inflamatórios da mucosa oral, contra herpes genital, lesões, abscessos de pele e mucosas, amidalites, faringites, estomatites, gengivite, glossite, diarreias de origem bacteriana e parasitária, cólicas, hemorroidas, infecções de vias urinárias e genitais, infecções por fungos, conjuntivites e doenças respiratórias, como bronquites, dentre outros. (MATOS, 2002; LEE et al., 2010).

2.2.2 Componentes químicos e atividades biológicas

Segundo Jurenka (2008) há uma vasta lista de componentes encontrados em diversas partes da planta. O suco extraído da polpa das sementes, por exemplo, é rico em antocianinas, glicose, ácido ascórbico, ácido elágico, ácido gálico, ácido caféico, catequina, quercetina, rutina, numerosos minerais, partículas de ferro e aminoácidos. O óleo extraído das sementes, por sua vez é constituído de 95% de ácido punícico dentre outros componentes como ácido elágico, ácidos de outras famílias e esteróis. O pericarpo do fruto é constituído por punicalaginas, ácido gálico, catequinas, quercetina, rutina, flavonas e flavonoides e antocianinas. Nas folhas de *P. granatum* são encontrados taninos como punicalaginas, glicosídeos de flavona incluindo luteolina e apigenina. Nas flores são encontrados constituintes como ácido gálico, ácido ursólico, triterpenoides como ácido maslínico. Por fim, a casca e raízes do vegetal apresentam elagitaninos incluindo punicalina e punicalagina e numerosos alcalóides de piperidina.

Possui como constituintes grandes quantidades de taninos e flavonoides aos quais se pode atribuir atividade anti-inflamatória (LEE et al., 2010), antisséptica e antimicrobiana (JURENKA,

2008). Estudos anteriores comprovam atividade bactericida e bacteriostática de *P. granatum* obtidos através da determinação da concentração inibitória mínima sobre uma abrangente quantidade de microrganismos (PEREIRA, 2002; MACHADO et al., 2002).

O extrato de *P. granatum* tem ampla atividade antimicrobiana atuando tanto sobre bactérias quanto fungos (DAHAM et al., 2010). Apresentou potencial satisfatório contra *S. aureus* e também sobre *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), o que demonstra a viabilidade na sua utilização no tratamento de infecções graves (PESSINI et al., 2003; MICHELIN et al., 2005). Demonstrou, também, atividade inibitória contra diversos outros microrganismos: causadores de diarreia (*Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella enterica*, *Salmonella brunei*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*); fermentos (*Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*); infecções respiratórias (*Klebsiella pneumoniae* e *Haemophilus parahaemolyticus*) e infecções na pele (*Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*) (MOORTHY et al., 2013).

As principais atividades biológicas da *P. granatum* estão associadas aos compostos secundários encontrados em toda a sua extensão. Na casca do fruto, em especial, os principais componentes são compostos fenólicos como flavonoides (antocianinas e catequinas) e taninos (punicalina, pedunculagina, punicalagina) e estão fortemente relacionados à ação antioxidante (ISMAIL et al., 2012). Outros importantes componentes como ácido gálico, ácido elágico e a punicalagina possuem atividade antibacteriana contra representantes da microbiota intestinal, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp e *Shigella* spp bem como contra *Vibrio cholerae* (PAI et al., 2011).

Estudos recentes como o de Assaf et al., (2016) avaliam *in vitro* o efeito anti-inflamatório da *P. granatum*. As células de PBMC tratadas com o extrato apresentaram redução na liberação da citocina IL-6 e aumento da citocina regulatória IL-10. O estudo da ação antimicrobiana do extrato é de grande importância, uma vez que a resistência aos medicamentos antimicrobianos tem se tornado cada vez mais frequente. Assim como infecções causadas por *S. aureus*, as infecções causadas por *Staphylococcus epidermidis* representam um grave problema de saúde pública. Segundo Betanzos-Cabrera et al., (2015) *P. granatum* também atua combatendo cepas de isolados clínicos de infecções oculares, demonstrando o alto potencial dessa espécie vegetal.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Investigar o efeito do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto de *Punica granatum* (EBPg) em modelo de sepse letal polimicrobiana em camundongo.

3.2 Específicos:

- ✓ Investigar o efeito do tratamento com o extrato, subcutâneo e em dose única, na sobrevida de animais sépticos;
- ✓ Investigar o efeito do extrato sobre a disseminação bacteriana *in vivo*;
- ✓ Verificar se o tratamento com o extrato reverte o perfil inflamatório sistêmico induzido pela sepse;
- ✓ Verificar se o tratamento com o extrato interfere na migração e proliferação de leucócitos;
- ✓ Verificar se o tratamento com o extrato altera o perfil fenotípico de leucócitos e da ativação da imunidade adaptativa e produção de reativos pela imunidade inata;
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento em órgãos comumente afetados pela sepse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato vegetal

O extrato bruto padronizado hidroalcoólico (70%) da casca do fruto de *Punica granatum* foi cedido pela Apis Flora® e mantido em temperatura ambiente até o momento de uso. Os testes de estabilidade química e controle microbiológico do extrato foram devidamente realizados pela empresa. A preparação para o uso seguiu as seguintes etapas: secagem e ressuspensão do material seco em tampão fosfato-salino (PBS). O referido extrato apresenta as seguintes especificações: densidade = 0,929 g/mL; pH = 4,6; sólidos = 5,18% p/v; teor alcoólico = 50,0°GL; flavonoides = 1,92 mg/mL; fenóis totais (taninos) = 41,2 mg/mL.

4.2 Animais

Foram usados camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, com idade entre 8 a 10 semanas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos com livre acesso à ração e água durante todo o estudo, e submetidos a ciclos de luz/escuridão de 12 horas. O estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovado com número de protocolo 23115.002346/2015-45.

4.3 Desenho Experimental

Foram realizados dois experimentos *in vivo*: (1) análise de sobrevivência e (2) avaliação de parâmetros celulares/imunológicos/funcionais, com o “n” amostral de 5 animais por grupo. Para sobrevivência, os animais foram distribuídos em cinco grupos: controle sem tratamento (G1 - CLP); controle tratado com antibiótico padrão (Imipenem) de amplo espectro (G2 - ATB); tratamento 6 horas antes da CLP (G3); tratamento imediatamente após a CLP (G4 - Concomitante) e tratamento 6 horas depois da CLP (G5).

Inicialmente, realizou-se o tratamento, em dose única, com EBPg na concentração de 5mg/kg, por via subcutânea, no grupo G3, 6 horas antes da CLP. Após 6 horas realizou-se a indução da sepse letal por CLP nos grupos G1, G2, G4 e G5. O tratamento dos grupos G2 e G4 foram realizados com antibiótico Imipenem e com EBPg, respectivamente, imediatamente após a CLP. Após 6 horas da indução da sepse no G5 os animais deste grupo foram tratados com EBPg. Todos os animais foram acompanhados por 5 dias e tiveram frequência de óbito anotada a cada 12 horas. A Figura 7A representa esquematicamente este experimento.

Para o experimento 2 os animais foram distribuídos em três grupos: 1) SHAM (animal que passou pelo processo cirúrgico, teve o ceco exposto, porém não foi perfurado e não recebeu ligadura, recebeu soro fisiológico estéril 0,9%), 2) CLP (recebeu ligadura e perfuração cecal e recebeu soro fisiológico estéril 0,9%), 3) CLP+EBPg (recebeu ligadura e perfuração cecal e foi tratado com dose única do EBPg - 5 mg/kg por via subcutânea imediatamente após a indução da sepse) (Figura 7B).

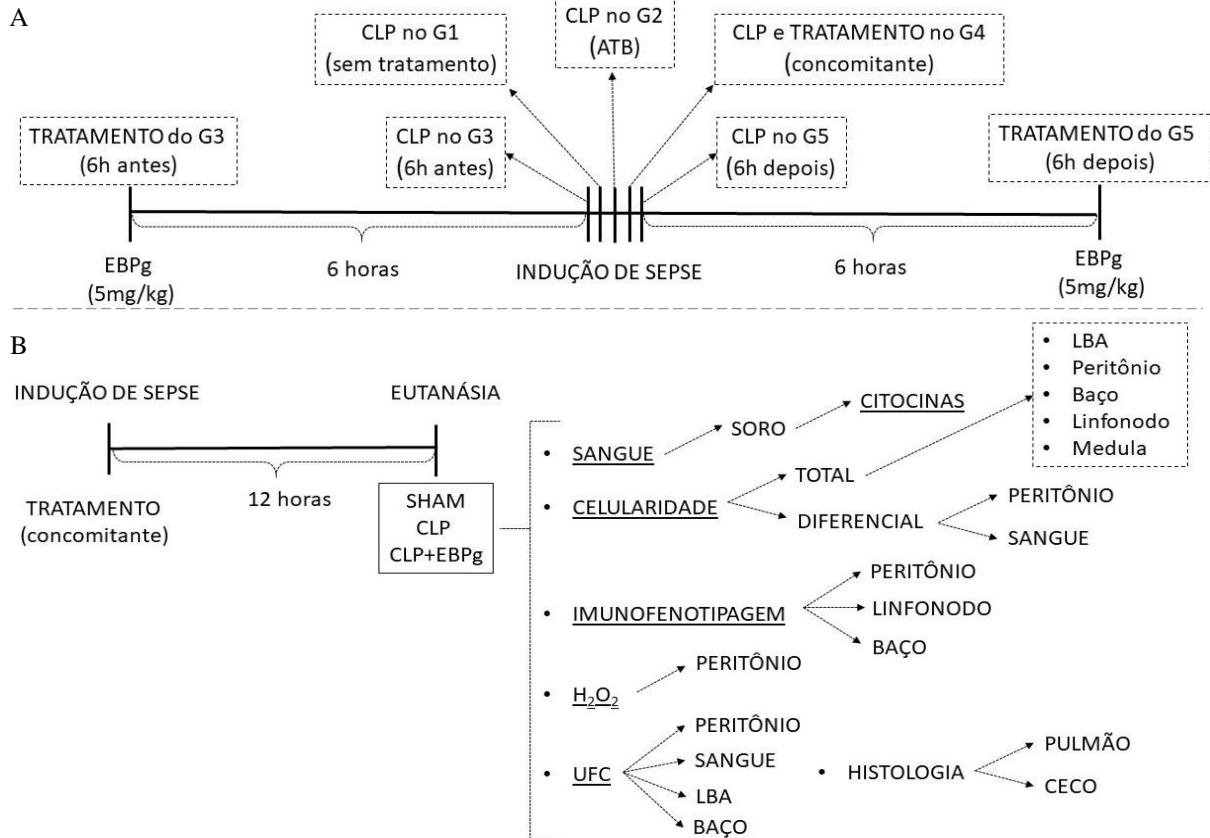


Figura 7. Esquemas representativos do desenho experimental dos ensaios de sobrevivência e de avaliação de parâmetros celulares/imunológicos/funcionais. (A) Desenho experimental da sobrevivência. Foram utilizados 5 grupos (EBPg 6h antes, CLP, ATB, EBPg concomitante e EBPg 6h depois) com n amostral de 5 animais cada. Inicialmente os animais do grupo EBPg foram tratados 6 horas antes da indução de sepse. Posteriormente os animais dos grupos CLP, ATB, EBPg concomitante e EBPg 6h depois foram submetidos à indução de sepse letal por CLP. Imediatamente após a indução, os animais do grupo ATB e EBPg concomitante foram tratados com Imipenem e EBPg, respectivamente. Os animais do grupo CLP não receberam tratamento. Após 6 horas, o grupo EBPg 6h depois recebeu tratamento. O EBPg foi administrado por via subcutânea, em dose única de 5mg/kg. Os animais foram acompanhados por 5 dias, com frequência de óbito observada a cada 12h. (B) Desenho experimental para avaliação de parâmetros celulares/imunológicos/funcionais. Foram utilizados 3 grupos (Sham, CLP, CLP+EBPg) com n amostral de 5 animais cada. Inicialmente todos os animais foram submetidos à indução de sepse e após 12 horas os mesmos animais foram eutanasiados para avaliação dos seguintes parâmetros: avaliações de leucócitos no sangue; celularidade por meio da contagem total e diferencial; dosagem de citocinas no soro; perfil e ativação celular por meio da imunofenotipagem de células do peritônio, linfonodo e baço; dosagem de produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas células do peritônio e avaliação do crescimento bacteriano no sangue, peritônio, LBA e baço por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e avaliação de danos teciduais por meio de análise histopatológica do pulmão e ceco.

4.4 Indução da sepse letal polimicrobiana

Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (Rompum® - 20 mg/kg) e ketamina (Vetanarcol® - 25 mg/kg) (MACHADO et al., 2012) por via intramuscular. A infecção polimicrobiana foi induzida por CLP (Cecal Ligation and Puncture) iniciada com uma laparotomia. O ceco, então, foi exposto e realizou-se a ligadura abaixo da válvula ileocecal. Posteriormente, foi perfurado dez vezes com agulha de calibre 18 G, para indução de sepse letal (MACIEL et al., 2008), levemente pressionado para extravasamento do conteúdo fecal e colocado de volta na cavidade peritoneal. Após este procedimento, o abdômen foi suturado. Todos os animais receberam 1mL de soro fisiológico estéril após o procedimento cirúrgico via subcutânea, como fluido de ressuscitação, com a finalidade de prevenir a hipotensão pós-operatória (WICHTERMANN et al., 1980; BAKER, 1983; BENJAMIM et al., 2002). O mesmo procedimento para indução da sepse ocorreu tanto nos animais destinados ao experimento 1, quanto ao experimento 2. Após o término do período de observação no experimento 1, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico (150 mg/kg Cloridrato de Ketamina e 120 mg/kg Cloridrato de Xilazina).

4.5 Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC)

Para a quantificação de bactérias no sangue, lavado peritoneal, LBA e baço foram coletados 10µL do exsudato e feita diluição seriada em placas de 96 poços contendo 90 µL de PBS em cada poço. Em seguida, alíquotas de 100µL destas diluições foram semeadas em placas de Petri em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI). Para o sangue foram plaqueadas as diluições 1:10² e 1:10⁴, para o lavado peritoneal as diluições de 1:10⁵ e 1:10⁸, para o LBA as diluições de 1:10¹ e 1:10², para o baço a diluição de 1:10¹. A semeadura foi realizada com auxílio de alça de Drigalski para espalhamento uniforme da alíquota. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, por 24h, para crescimento de colônias bacterianas. Após a contagem de colônias realizou-se o cálculo seguindo a fórmula abaixo, para cada animal:

$$\text{UFC/mL} = \frac{(a1 \times b1) + (a2 \times b2)}{c} \times 10^d$$

Onde: a1 = contagem de colônias na placa 1 do animal 1

b1 = diluição 1 plaqueada do animal 1

a2 = contagem de colônias na placa 2 do animal 1

b2 = diluição 2 plaqueada do animal 1

c = número de placas contadas

d = potência referente à maior diluição plaqueada

4.6 Avaliação de parâmetros hematológicos

Após a anestesia, amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção retro orbital e o sangue transferido para microtubos. Os esfregaços sanguíneos foram realizados com 10µL de sangue para posterior contagem de leucócitos e foram corados com a utilização do kit Instant Prov (Newprov). Os parâmetros hematológicos (contagem diferencial) foram determinados por técnicas manuais, segundo Oliveira (2007). Os tubos com sangue foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, para obtenção do soro que foi separado para determinação de citocinas.

4.7 Obtenção das células peritoneais e do lavado bronco alveolar (LBA)

Os camundongos foram eutanasiados e as células peritoneais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de PBS estéril. A solução celular foi separada para posterior realização de imunofenotipagem e dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para obtenção das células do lavado bronco alveolar (LBA) a traqueia dos animais foi exposta, canulada e com o uso de uma seringa foi injetado 1mL de PBS no espaço bronco alveolar sendo aspirado em seguida.

Para a contagem do número total de células peritoneais e do LBA as suspensões celulares foram coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1. As células foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico com um aumento de 400 vezes em luz comum. Para a contagem diferencial 200µL das suspensões celulares, com ajuste para 2×10^5 de células, foram centrifugados em CitoSpin e as lâminas foram posteriormente coradas com kit Instant-Prov (Newprov, Pinhais, Brazil). A contagem das células foi feita em microscópio óptico de luz comum.

4.8 Contagem de células do baço, do linfonodo e da medula óssea

As células da medula óssea, baço e linfonodo foram obtidas das seguintes formas: o fêmur foi perfundido com 1 mL de PBS para obtenção das células da medula óssea; o baço e o linfonodo foram triturados com auxílio da parte fosca de lâminas de vidro e as células resultantes foram lavadas com 5 mL e 1 mL de PBS, respectivamente. Para determinar o número total de células, nove volumes da suspensão de células foram adicionados a 1 volume de cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30%. As células foram contadas em de câmara de Neubauer em microscópio ótico. A solução de células do linfonodo e do baço foi separada para posterior realização de imunofenotipagem.

4.9 Avaliação do burst oxidativo por “Dihydrorhodamine” 123 (DHR)

Para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a suspensão de células da cavidade peritoneal foi contada e ajustada para uma concentração de 1×10^6 /mL. Posteriormente foi distribuída (500 μ L) em microtubos. Estas células foram marcadas com o DHR (375ng/mL)(10, 37°C) sendo estimuladas ou não com acetato de miristato de forbol (PMA) (50nM)(1h, 37°C). Após o tempo de incubação com PMA, colocou-se os tubos em banho de gelo, por 10 minutos, para encerrar todas as reações. Posteriormente, lavou-se a suspensão celular com PBS, centrifugando a 4°C, e a reação foi lida em citômetro de fluxo. A leitura foi feita no canal FL-1, com os parâmetros de complexidade (SSC) e tamanho celular (FSC) definindo o *gate* de aquisição das células. Para análise, 5000 eventos foram adquiridos e posteriormente avaliados no software FlowJo (Tree Star Inc.) (CHEN; JUNGER, 2012).

4.10 Determinação de citocinas do soro

O soro dos animais foi utilizado para dosagem das citocinas IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1, INF- γ , TNF por meio do kit citocinas *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation*, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences). Cinco populações de partículas chamadas de "*beads*", com distintas intensidades de fluorescência detectada em FL3 e conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, foram incubadas com alíquotas de soro ou padrão e com anticorpo de detecção conjugado com Ficoeritrina (PE) detectado em FL2 para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para o ensaio foram preparados com: 25 μ L de amostra, 25 μ L da mistura de *beads* e 25 μ L do reagente de detecção. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por duas horas, em temperatura ambiente, no escuro, conforme orientações do fabricante. Os resultados foram adquiridos por citometria de fluxo com *FACScalibur* (BD Biosciences) e analisados utilizando-se o software *FCAP Array* versão 3.

4.11 Imunofenotipagem das células do peritônio, baço e linfonodo

Após contagem de células da cavidade peritoneal, linfonodo mesentérico e do baço, 10^6 células/mL foram ressuspensas e transferidas para uma placa de 96 poços de fundo em “U”, marcadas com os anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos.

Foram montados 3 painéis de marcação para cada órgão, com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos. Para linfonodo e baço foram utilizados: anti-CD3

(FITC); anti-CD28 (PE) e anti-CD4, anti-CD8 (PerCP), anti-CD86 (APC) e anti-CD11c (PeCy7) de acordo com a Tabela 2. Para as células do peritônio foram montados 3 painéis de marcação: anti-CD3 e anti-CD14 (FITC); anti-CD69 e anti-IaIe (PE) e anti-CD4, anti-CD8 e anti-Ly6G/6C (PerCP) de acordo com a Tabela 3.

Tabela 2. Pannel de marcadores para as células do baço e linfonodos

FLUOCROMO	FITC	PE	PERCP	PERCy7	APC	CÉLULAS DE INTERESSE
PAINEL 1	CD3	CD28	CD4			Linfócitos T helper ativados
PAINEL 2	CD3	CD28	CD8			Linfócitos T citotóxicos ativados
PAINEL 3				CD 11c	CD86	Células dendríticas ativadas

Tabela 3. Pannel de marcadores das células do lavado peritoneal

FLUOCROMO	FITC	PE	PERCP	CÉLULAS DE INTERESSE
PAINEL 1	CD3	CD69	CD4	Linfócitos T helper ativados
PAINEL 2	CD3	CD69	CD8	Linfócitos T citotóxicos ativados
PAINEL 3	CD14	IaIe	Ly6G/6C	Fagócitos

Inicialmente as células foram dispostas por tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) e morfologicamente caracterizadas como linfócitos. Após isso utilizou-se os parâmetros tamanho (FSC) versus CD3. Desse modo, delimitou-se o *gate* de localização da população geral de linfócitos T conforme figura 8A. Com o objetivo de caracterizar as subpopulações de linfócitos T, utilizou-se o *gate* inicial dos linfócitos T CD3⁺, selecionando os parâmetros CD4 versus CD8. Dessa forma, foi possível assumir as populações dos linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Com o objetivo de avaliar o estado de ativação dessas células, foi selecionado o parâmetro FSC versus CD69. Em cada população de linfócitos, o valor relativo (%) e a frequência absoluta foram definidos. Esse procedimento foi efetuado para todas as amostras referentes aos 3 locais de origem celular (peritônio, linfonodo e baço).

Além disso, as células do baço e linfonodo foram dispostas por tamanho (FSC) versus expressão de IaIe para definição da população das células apresentadoras de antígenos conforme figura 8B. Para delimitação da subpopulação de células dendríticas foi utilizado marcador CD11c⁺ e para observar o grau de ativação desta subpopulação utilizou-se a expressão do marcador CD86.

Para delimitação da população de fagócitos na região peritoneal foram utilizados os parâmetros tamanho (FSC) versus expressão de Ly6C/6G conforme figura 8C. As populações de macrófagos e neutrófilos foram delimitadas, por método de exclusão, dentro deste *gate* inicial (Ly6C/6G⁺). Macrófagos foram definidos como CD14⁺Ly6C/6G⁺ e neutrófilos como CD14⁻Ly6C/6G⁺. As amostras foram adquiridas em citômetro (Guava® easyCyte HT Sampling Flow Cytometer) e os dados analisados com o programa FlowJo Versão 10.0 (TreeStar).

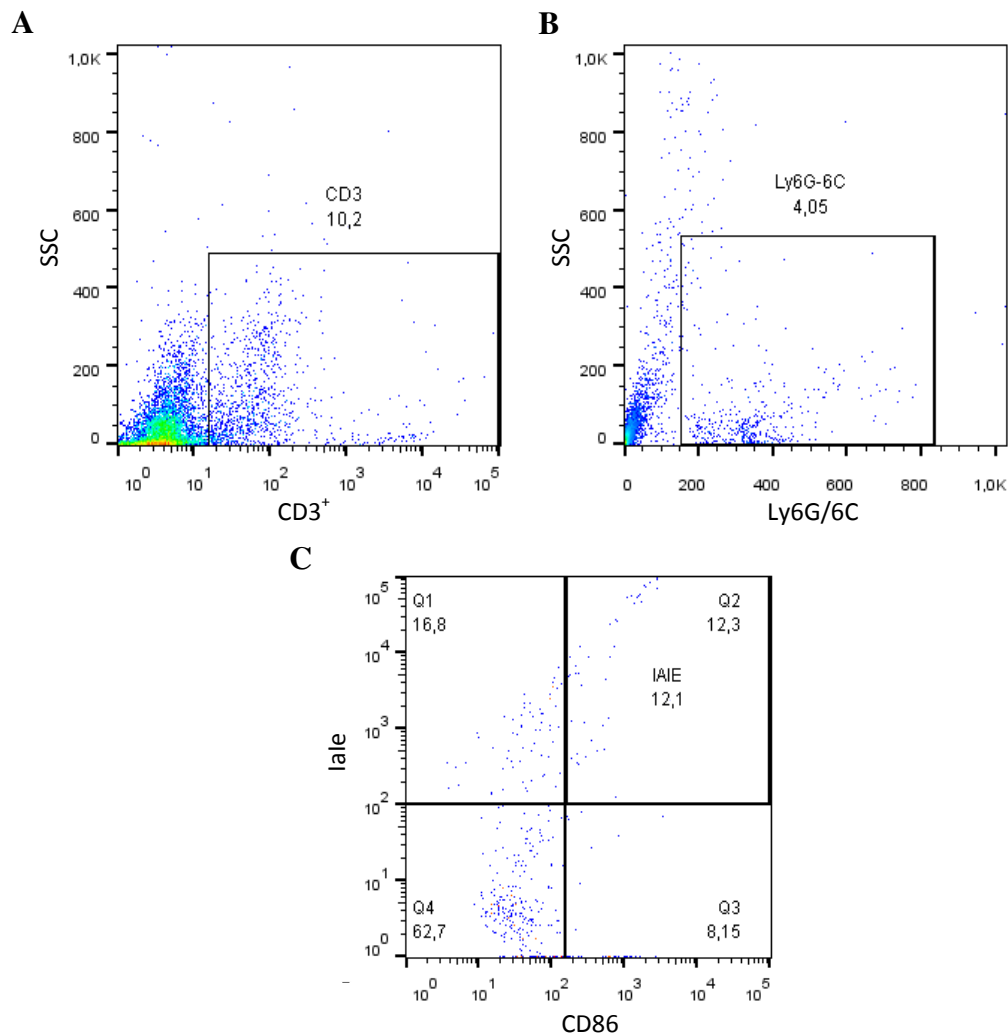


Figura 8. Estratégias de aquisições de populações a serem analisadas na imunofenotipagem. (A) Gate de aquisição da população de linfócitos (CD3⁺) para posterior aquisição de subpopulações de linfócitos, (B) Gate de aquisição da população de células com expressão de Ly6C/6G, para posterior aquisição de população de fagócitos (macrófagos e neutrófilos), (C) Gate de aquisição da população de células com expressão de IaIe, para posterior aquisição de células apresentadoras de antígenos ativadas

4.12 Análise histopatológica

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

4.13 Análise estatística

Os resultados estão expressos erro padrão da média e desvio padrão e foram submetidos ao teste de normalidade D'Agostino & Pearson e posterior análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas (Newman-Keuls). Além disso, utilizou-se o teste T Student para avaliação de diferença estatística entre os grupos tratado e não tratado, especificamente. Para todos os testes utilizou-se o software Graph Pad Prism, versão 5.0, com um nível de significância de 5% (SOKAL; ROHLF, 1996).

5 RESULTADOS

5.1 EBPg aumenta sobrevida de camundongos sépticos

Para verificar se o EBPg influencia no tempo de vida de animais sépticos e qual melhor tempo de tratamento, realizou-se o ensaio de sobrevida. Notou-se que a indução de sepse letal por CLP foi eficaz, visto que os animais não tratados tiveram 100% de óbito já no segundo dia. O EBPg teve ação terapêutica, uma vez que, tanto o grupo com tratamento depois quanto o tratamento concomitante foram capazes de manter a sobrevida dos animais e que o grupo com tratamento profilático teve 100% de óbito. Destaca-se que o tratamento realizado imediatamente após a indução da sepse (concomitante) garantiu, aproximadamente, 65% de sobrevida, sendo esse o melhor resultado obtido e, portanto, utilizado no experimento subsequente (Figura 9).

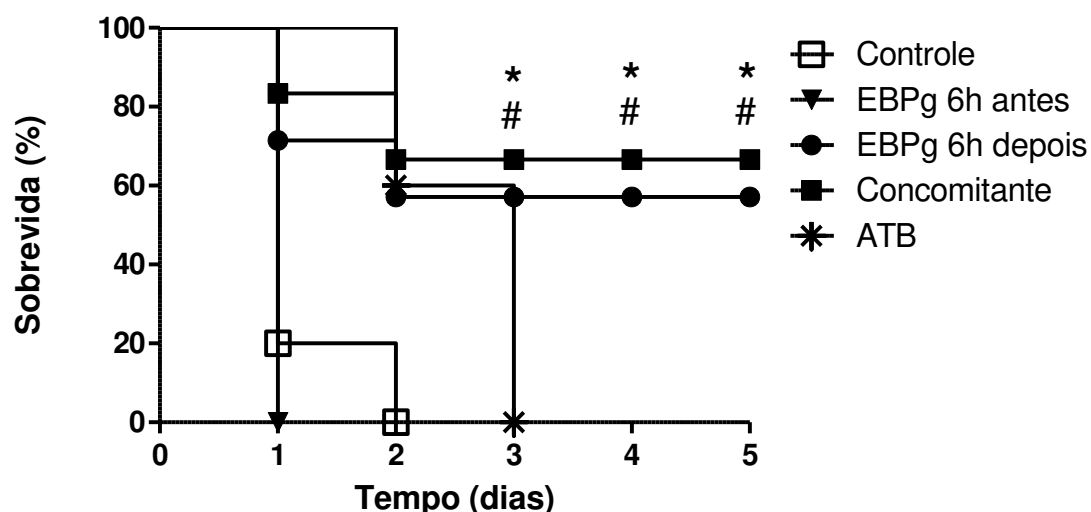


Figura 9. Efeito do extrato bruto hidroalcoólico da casca do fruto de *Punica granatum* (EBPg) na sobrevida de animais sépticos. Os animais foram distribuídos em 5 grupos ($n = 5$ por grupo): Controle – animais sépticos (CLP) sem tratamento, EBPg 6h antes – animais tratados com dose única (5mg/Kg) de EBPg, 6h antes da indução da sepse, EBPg concomitante – animais tratados, em dose única, imediatamente após a indução da sepse, EBPg 6h depois – animais tratados, em dose única, 6h depois da indução da sepse e ATB – animais tratados, em dose única, logo após a indução da sepse com antibiótico de amplo espectro (Imipenem), seguindo a proporção de concentração para o peso dos animais. Todos os tratamentos foram realizados por via subcutânea. A sobrevida foi acompanhada por 5 dias sendo a frequência de óbito anotada a cada 12h. Utilizou-se o teste estatístico log-rank e a diferença significativa está representada por: * entre os grupos concomitante e tratamento 6h depois e # entre os grupos concomitante e controle, adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.2 EBPg reduz crescimento bacteriano no sangue, baço, lavado bronco alveolar e peritônio

Verificou-se que houve crescimento de colônias em placas do sangue e do baço, confirmando a disseminação bacteriana sistêmica, assim como o estado séptico ao qual os animais foram induzidos. Além disso, encontrou-se diferença estatística em todos os parâmetros avaliados (sangue, peritônio, LBA e baço) quando comparado o grupo tratado com o grupo não tratado, mostrando que o EBPg foi capaz de reduzir a quantidade de UFC (Figura 10).

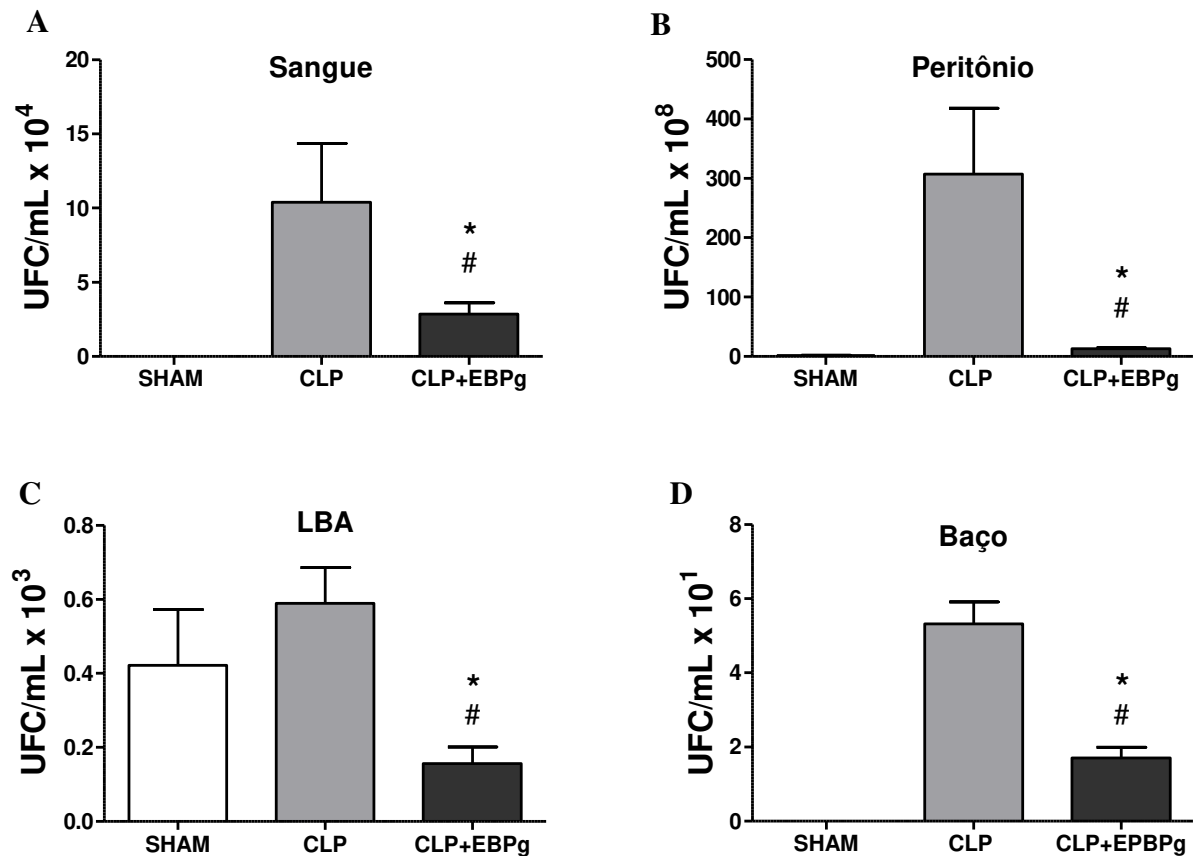


Figura 10. Efeito do EBPg no crescimento de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs). Representações gráficas das médias das contagens de Unidades Formadoras de Colônia do sangue (A), lavado peritoneal (B), lavado bronco alveolar (C) e macerado do baço (D). Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: * entre os grupos CLP e CLP+EBPg e # entre os grupos SHAM e CLP+EBPg. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.3 EBPg aumenta quantidade de células do sangue periférico

Para identificar os tipos celulares presentes no sangue periférico realizou-se a contagem diferencial. De acordo com dados obtidos, nota-se que a quantidade de linfócitos e neutrófilos é significativamente maior que a quantidade de monócitos, em todos os grupos analisados, com destaque para o grupo tratado. Observa-se que o extrato promoveu aumento de células totais, bem como o de linfócitos e neutrófilos no sangue periférico quando comparado ao grupo CLP sem tratamento (Figura 11).

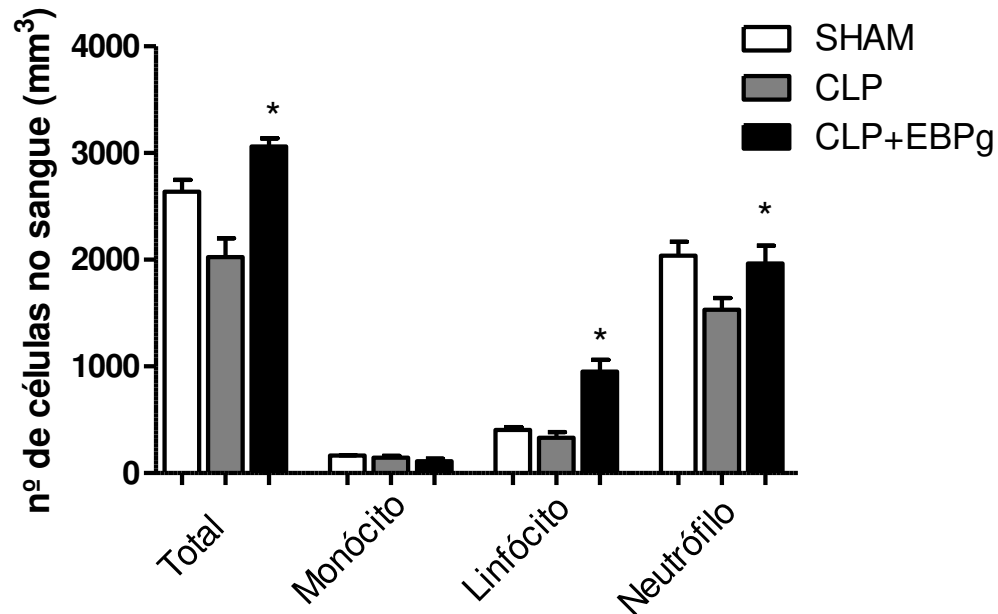


Figura 11. Contagem diferencial de células do sangue. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. A diferença estatística significativa está representada por: *em relação ao grupo CLP. Os dados representam a média $\pm$ SD, baseado na contagem de 100 células por lâmina de esfregaço proporcionais à contagem total equivalente. n=5 animais por grupo, adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.4 EBPg aumenta quantidade de células totais no foco infeccioso e reduz no baço

Para avaliar o efeito do EBPg no foco infeccioso e em um órgão com abrangência sistêmica, realizou-se a contagem de células totais do peritônio e baço. Houve redução da quantidade de células no baço dos animais tratados em relação aos animais não tratados (Figura 12A) e aumento de células peritoneais no grupo tratado, diferindo estatisticamente do grupo CLP, não tratado (Figura 12B).

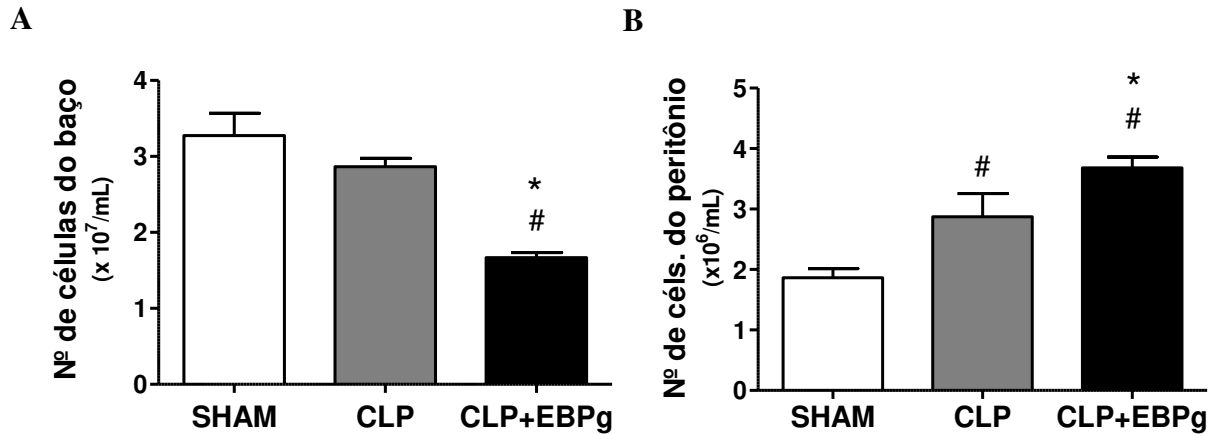


Figura 12. Número de células do baço e da cavidade peritoneal. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. (A) Número de células no baço por 10⁷/mL. (B) Número de células na cavidade peritoneal por 10⁶/mL. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: * entre os grupos CLP e CLP+EBPg e # entre os grupos SHAM e CLP+EBPg. Os dados representam a média ± SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.5 EBPg não altera a celularidade no lavado bronco alveolar, medula óssea e linfonodos

Para avaliar o efeito do EBPg no influxo celular de um dos principais órgãos acometidos na sepse, realizou-se a contagem total de células no lavado bronco alveolar. Não houve diferença estatística entre os grupos tratado e não tratado, entretanto, houve maior quantidade de células no pulmão de animais com CLP (Figura 13A).

Para avaliar o efeito do EBPg nos órgãos linfoides primários, realizou-se a contagem de células totais na medula óssea, e nos órgãos linfoides secundários, realizou-se a contagem de células totais nos linfonodos mesentéricos (Figura 13C). Não houve diferença estatística entre os grupos na medula e nos linfonodos. Entretanto, é possível observar uma tendência de aumento de células na medula, proporcionado pelo EBPg (Figura 13B).

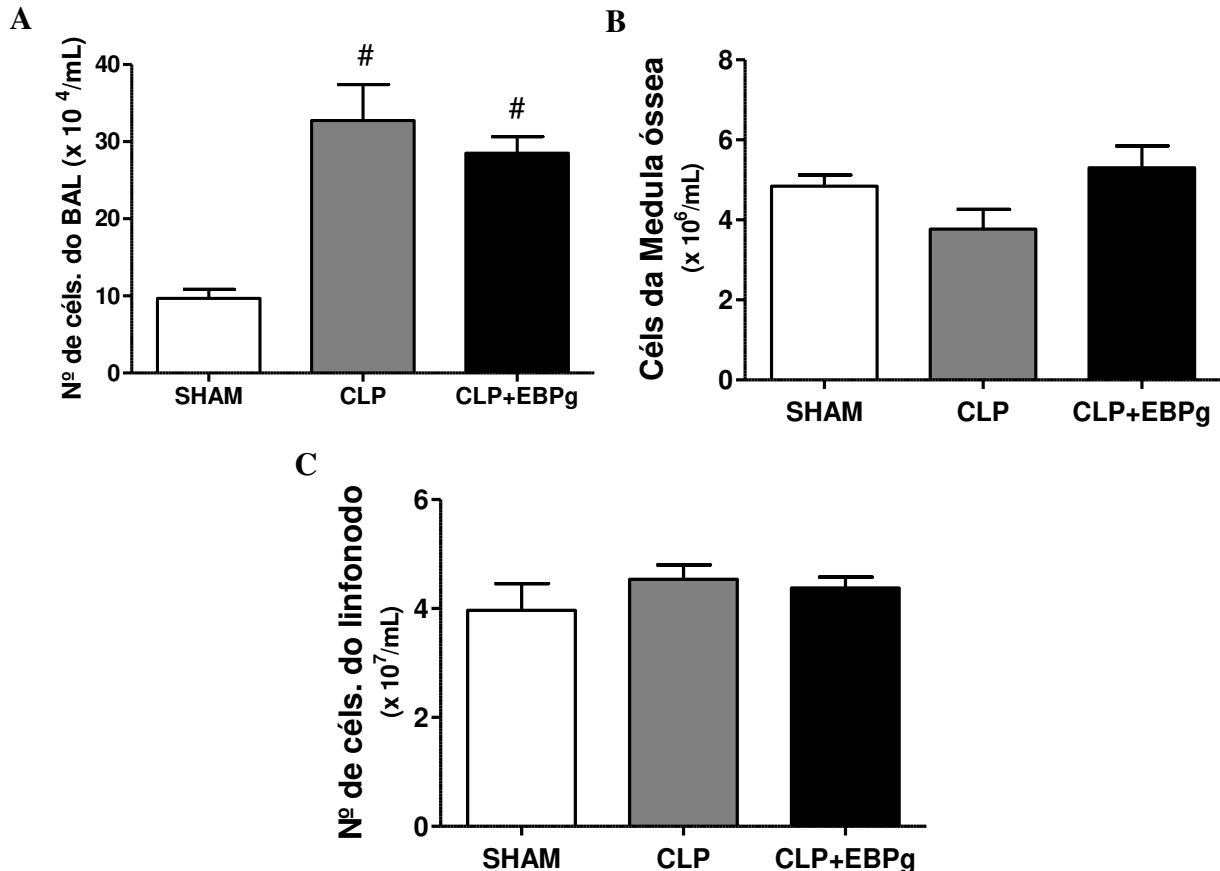


Figura 13. Número de células no lavado bronco alveolar, medula óssea e linfonodos mesentéricos. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. (A) Número de células do lavado bronco alveolar por $10^4/\text{mL}$. (B) Número de células na medula óssea por $10^6/\text{mL}$. (C) Número de células dos linfonodos mesentéricos por $10^7/\text{mL}$. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: # entre os grupos SHAM e CLP+EBPg. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.6 EBPg induz aumento do número de macrófagos e linfócitos no peritônio

Para verificar o efeito do EBPg e considerando o papel dos macrófagos e neutrófilos no controle do crescimento bacteriano, realizamos a contagem total e diferencial de células na cavidade peritoneal. O tratamento aumentou o influxo de células totais para o foco infeccioso. O padrão de resposta em relação aos neutrófilos foi o mesmo dos grupos CLP e CLP+EBPg, não apresentando diferença significativa. O tratamento aumentou o número de macrófagos e de linfócitos quando comparado com o grupo CLP sem tratamento. (Figura 14).

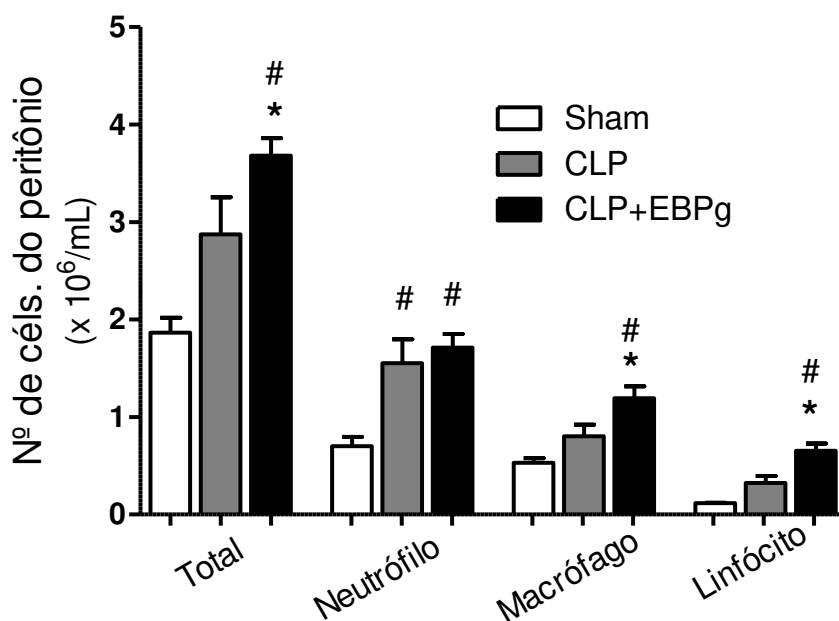


Figura 14. Contagem diferencial de células do lavado peritoneal. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: * entre os grupos CLP e CLP+EBPg e # entre os grupos SHAM e CLP+EBPg, n=5 animais. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.7 EBPg aumenta percentual de linfócitos T helper ativados e diminui percentual de linfócitos T citotóxicos no peritônio

Para avaliar o fenótipo apresentado pelas células presentes no local da infecção, foi realizada a marcação das células do lavado peritoneal, de modo a investigar a presença de linfócitos T e suas subpopulações, bem como a presença de fagócitos e células apresentadoras. O tratamento aumentou população de linfócitos T ($CD3^+$), como pode ser observado na figura 14A, assim como de linfócitos T auxiliares ativados (figura 15B). Entretanto, observou-se que o tratamento reduziu população de linfócitos T citotóxicos ativados (Figura 15C). Além disso, EBPg aumentou quantidade de fagócitos, representados na Figura 15D pelos neutrófilos, quando comparado com o grupo SHAM. EBPg não apresentou diferença estatística em relação aos macrófagos, mas demonstra uma tendência de aumento no grupo tratado (Figura 15E).

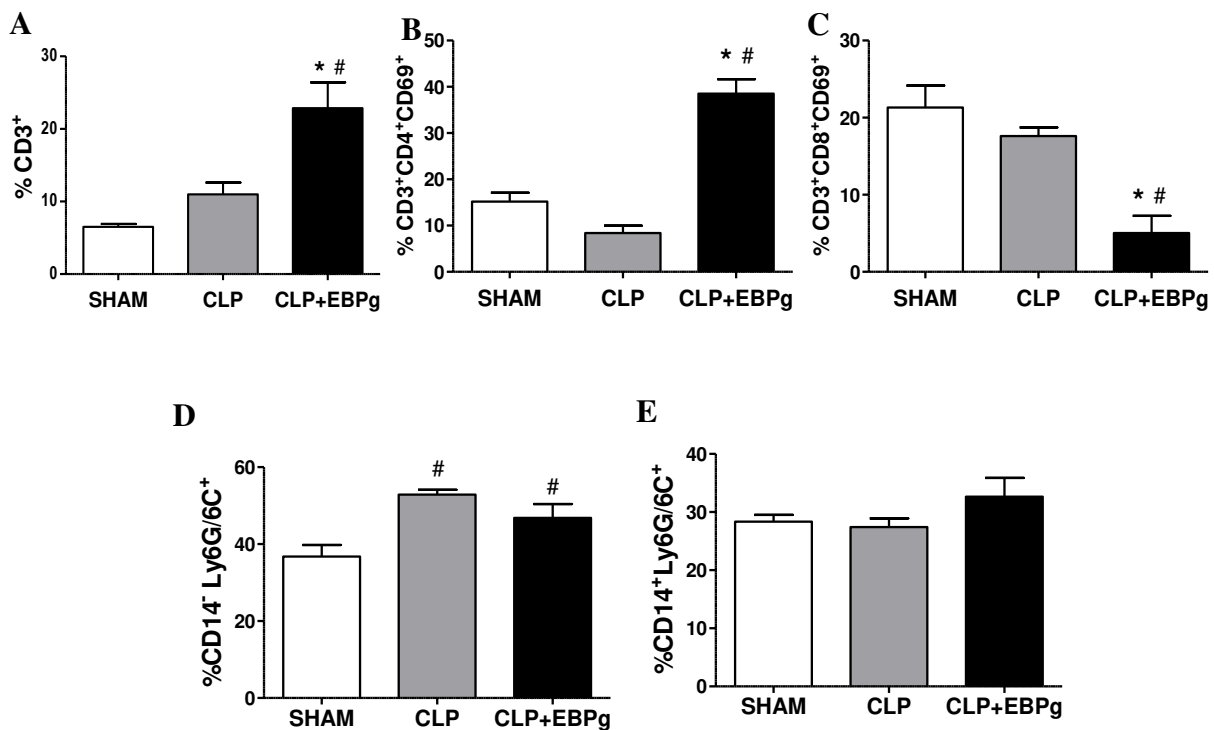


Figura 15. Imunofenotipagem de células do peritônio. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento em dose única. As células do peritônio foram isoladas e marcadas com os respectivos marcadores expressos nos gráficos. Percentual da população de linfócitos $CD3^+$ (A). Subpopulação de linfócitos auxiliares ativados $CD4^+CD69^+$ (B). Subpopulação de linfócitos citotóxicos ativados $CD8^+CD69^+$ (C). Percentual de células fagocíticas e granulócitos (D, E) sendo $CD14^+L6G/6C^+$ a marcação usada para designar neutrófilos e $CD14^+L6G/6C^+$ para designar macrófagos. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: * entre os grupos CLP e CLP+EBPg e # entre os grupos SHAM e CLP+EBPg, n=5 animais. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.8 EBPg reduz percentual de linfócitos auxiliares ativados e linfócitos citotóxicos ativados e aumenta percentual de células dendríticas ativadas nos linfonodos mesentéricos.

Com intuito de verificar o efeito do EBPg nos principais órgãos linfoides secundários avaliou-se o fenótipo celular nos linfonodos mesentéricos, considerados os gânglios drenantes mais próximos do foco infeccioso. Assim como no peritônio, houve aumento de linfócitos T $CD3^+$ (Figura 16A), em contrapartida houve diminuição de linfócitos T auxiliares ativados $CD4^+CD28^+$ (Figura 16B) e de linfócitos T citotóxicos ativados $CD8^+CD28^+$ (Figura 16C) no grupo tratado. Entretanto, houve aumento de células dendríticas ativadas $CD11c^+CD86^+$ (Figura 16D) embora estejam em porcentagem reduzida (2%).

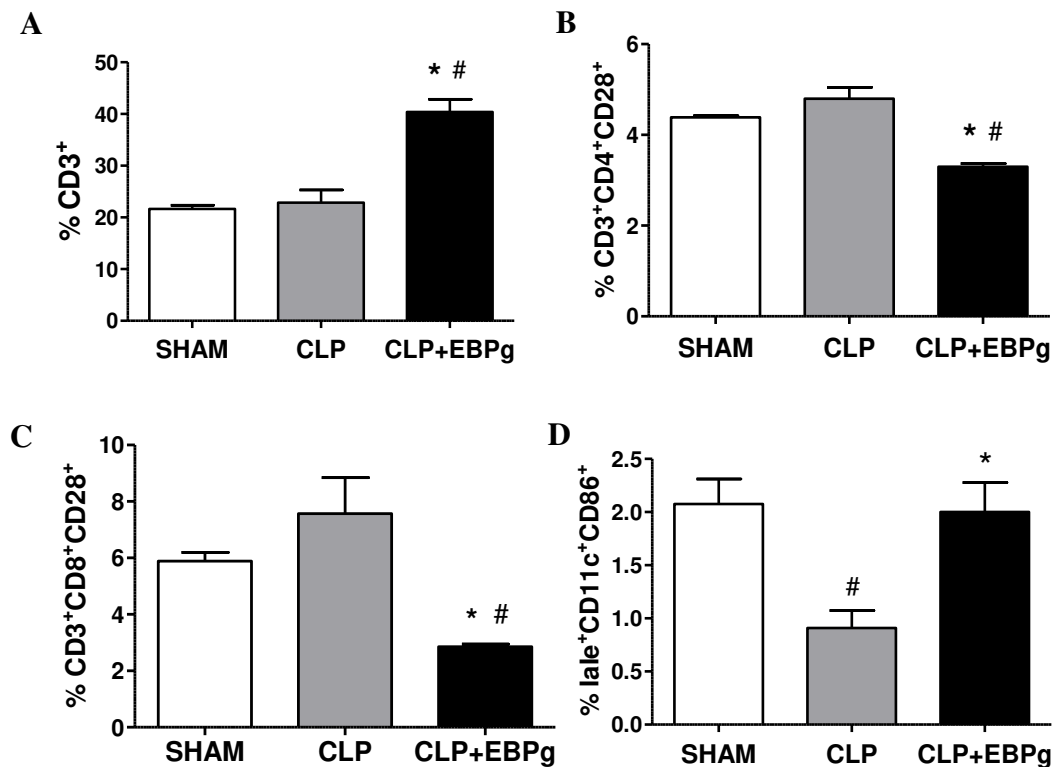


Figura 16. Imunofenotipagem de células dos linfonodos drenantes. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. As células do linfonodo foram isoladas e marcadas com os respectivos marcadores expressos nos gráficos. Percentual da população de linfócitos $CD3^+$ (A). Percentual da subpopulação de linfócitos auxiliares ativados $CD4^+CD28^+$ (B). Percentual de linfócitos citotóxicos ativados $CD8^+CD28^+$ (C). Percentual de células com dupla marcação para células dendríticas ativadas $CD11c^+CD86^+$ (D). Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: * entre os grupos CLP e CLP+EBPg e # entre os grupos SHAM e CLP+EBPg, n=5 animais. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.9 EBPg aumenta ativação de células apresentadoras no baço

Para verificar qual o efeito do EBPg nas células de um órgão com abrangência sistêmica em animais sépticos, realizou-se a imunofenotipagem de células no baço. Não houve diferença estatística entre os grupos tratado e não tratado em relação aos linfócitos T auxiliares ativados $CD4^+CD28^+$ (Figura 17A) e linfócitos T citotóxicos ativados $CD8^+CD28^+$ (Figura 17B). Houve diminuição no percentual de IaIe, molécula presente em todas células que apresentam MHC-II e, portanto, que estão relacionadas com apresentação de antígenos (Figura 17C). Entretanto, observou-se que, das células que possuem IaIe, o EBPg foi capaz de aumentar o percentual de apresentadoras ativadas (Figura 17D) e de células dendríticas ativadas (Figura 17E).

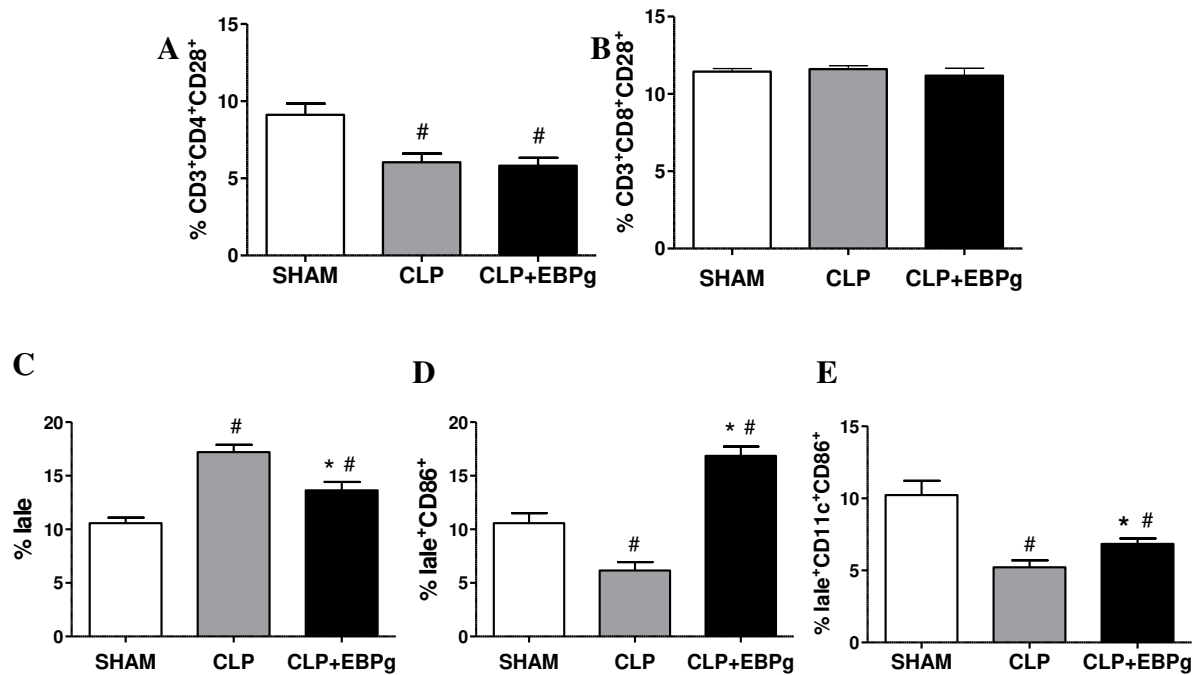


Figura 17. Imunofenotipagem de células do baço. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. As células do baço foram isoladas e marcadas com os respectivos marcadores expressos nos gráficos. Percentual das subpopulações de linfócitos T helper $CD4^+CD28^+$ (A) e linfócitos T citotóxicos $CD8^+CD28^+$ (B). Percentual de células apresentadoras de antígenos (expressão de molécula IaIe) (C). Percentual de células dendríticas ativadas $CD11c^+CD86^+$ (E). Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: * entre os grupos CLP e CLP+EBPg e # entre os grupos SHAM e CLP+EBPg, n=5 animais. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.10 EBPg aumenta liberação de citocinas inflamatórias e principalmente da citocina regulatória IL-10 no soro de animais sépticos

Para analisar o perfil de resposta imunológica ocasionado pela indução da sepse letal polimicrobiana e a influência do tratamento com EBPg, foi realizada a dosagem das citocinas IL-6 (interleucina 6), IL-10 (interleucina 10), MCP-1 (proteína quimiotática para macrófago - 1), IL-12 (interleucina 12), INF- γ (interferon gama) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa).

O tratamento com o EBPg proporcionou um aumento na produção de todas as citocinas avaliadas (Figura 18), com exceção da IL-12 foi produzida em níveis basais (dados não mostrados).

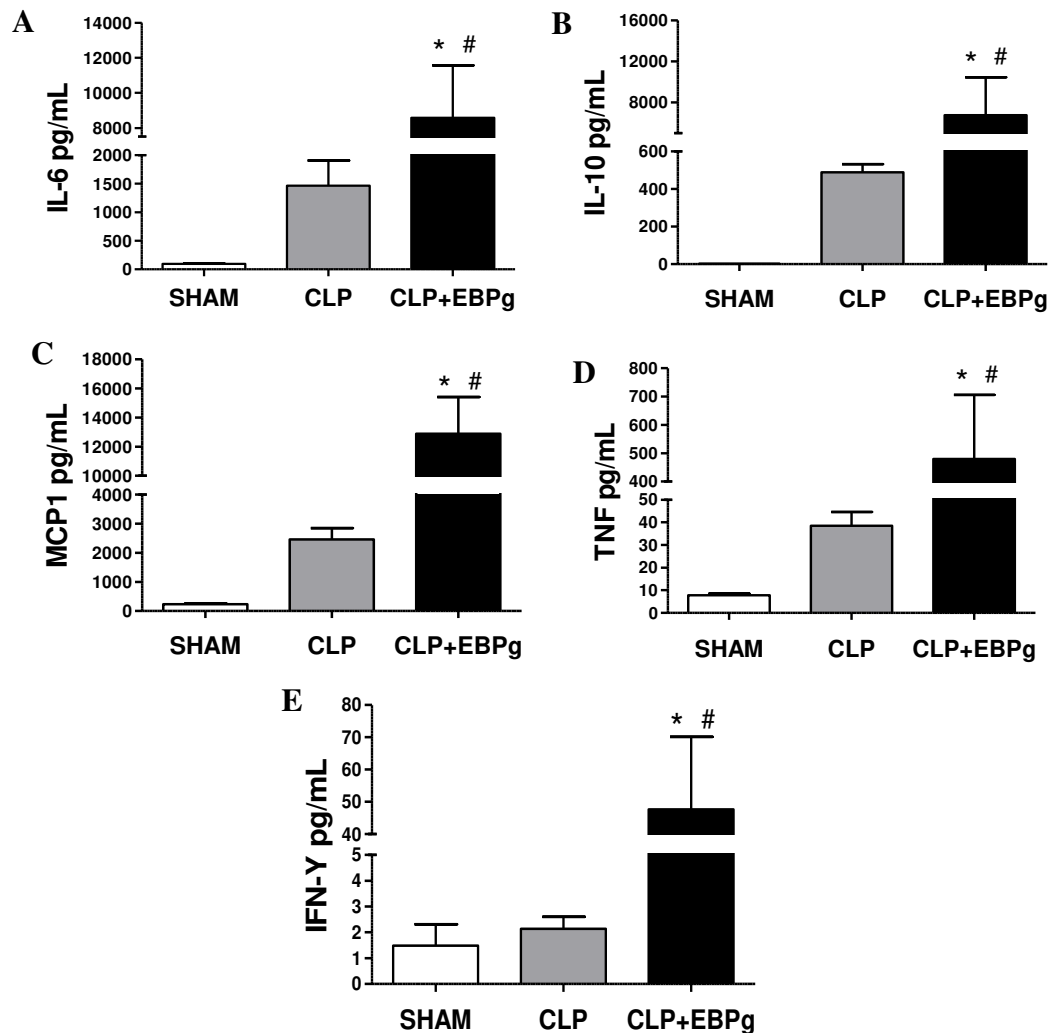


Figura 18. Dosagem de citocinas do soro de animais sépticos. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. Após coleta do soro dos animais, as citocinas IL-6 (A), IL-10 (B), MCP-1 (C), IFN- γ (D) e TNF (E) foram avaliadas. Utilizou-se o teste estatístico ANOVA seguido de pós teste Neman-Keuls e as diferenças significativas estão representada por: * entre os grupos CLP e CLP+EBPg e #

entre os grupos SHAM e CLP+EBPg, n=5 animais. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.11 EBPg controla produção exacerbada de peróxido de hidrogênio em células do peritônio

Para verificar o efeito do EBPg na produção de espécie reativa de oxigênio de células do foco infeccioso, avaliou-se a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células da cavidade peritoneal de animais sépticos. Observou-se que nos animais sépticos houve maior quantidade de células que produziram H_2O_2 e que o EBPg manteve essa quantidade elevada, porém com uma tendência à redução quando levado em consideração o grupo sem tratamento (Figura 19A). Além disso, é possível observar na Figura 19B que o EBPg foi capaz de diminuir a média da intensidade de fluorescência do grupo estimulado com PMA indicando um controle da produção de H_2O_2 quando há grandes estímulos.

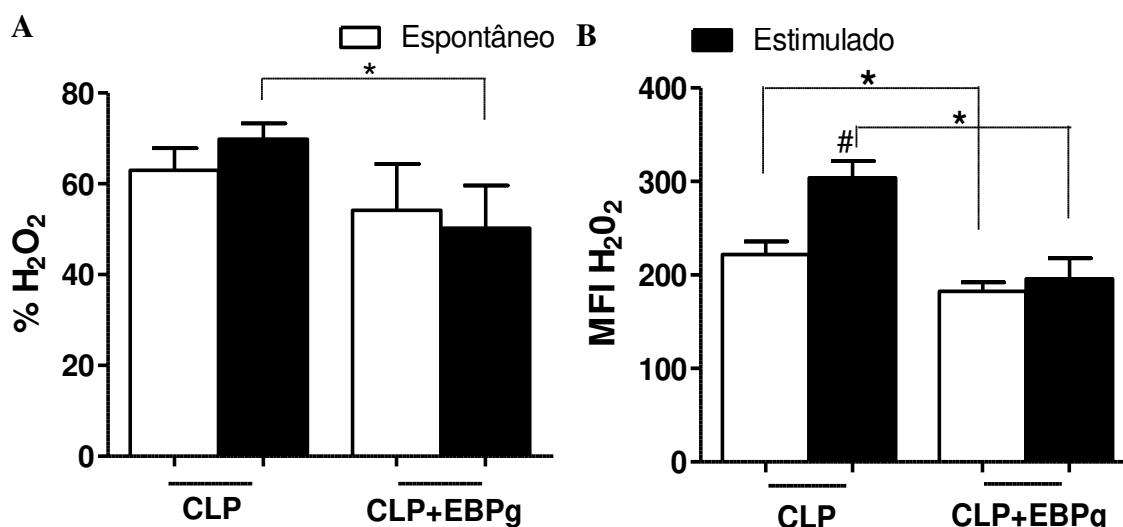


Figura 19. Produção de Peróxido de Hidrogênio em células peritoneais. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. (A) Porcentagem da produção de H_2O_2 por células do lavado peritoneal marcadas com DHR e estimuladas com PMA. (B) Média da Intensidade de Florescência de células marcadas com DHR e estimuladas com PMA. Utilizou-se o teste estatístico t Student e as diferenças significativas estão representada por: *. O símbolo # indica diferença entre os grupos espontâneo e estimulado, n=5 animais. Os dados representam a média $\pm$ SD adotando $p \leq 0,05$ como significância.

5.12 EBPg diminui hemorragia no pulmão de animais sépticos

Para averiguar se o tratamento com EBPg teria efeito sobre o tecido de órgãos como pulmão e ceco, realizou-se a avaliação histopatológica dos mesmos. Verificou-se que o tratamento foi capaz de reduzir significativamente a hemorragia no pulmão, aumentando, entretanto o edema no ceco. Não foi verificada diferença estatística nos demais parâmetros avaliados (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito do extrato hidroalcoólico da casca do fruto de *P. granatum* no tecido de pulmão e ceco de animais sépticos ou não sépticos, tratados ou não tratados.

ÓRGÃO	GRUPO	Hemorragia	Infiltrado	Necrose	Edema
Pulmão	SHAM	2 ± 1,1	1,5 ± 0,5	1 ± 1,1	2 ± 1,1
	CLP	3 ± 0	2,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	2 ± 1,1
	CLP+EBPg	2 ± 0 *	2 ± 0	1,7 ± 0,5	2 ± 0
Ceco	SHAM	1,5 ± 0,9	3 ± 0	2 ± 0	1,25 ± 0,46
	CLP	1,4 ± 0,8	2,2 ± 0,7	1,8 ± 0,7	1 ± 0,6
	CLP+EBPg	1,75 ± 0,46	2,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	2 ± 0,7 *

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Foi aplicado o teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis e teste t Student adotando $p \leq 0,05$ como significância. A diferença estatística está representada por * entre os grupos CLP e CLP+EBPg.

6 DISCUSSÃO

Os componentes químicos da *Punica granatum* garantem a essa espécie vegetal um grande número de atividades e propriedades biológicas, dentre as quais: efeito antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (RAHIMI et al., 2012). Essas propriedades são de especial importância em um quadro de sepse, caracterizado, inicialmente, como resposta inflamatória exacerbada (HOTCHKISS et al., 2016), estado de desequilíbrio no sistema redox (DESSAUER et al., 2011) e processo infeccioso severo (SINGER et al., 2016).

A atividade antioxidante da casca do fruto é atribuída à presença de compostos fenólicos na forma de antocianinas, galotaninas, elagitaninos, hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e di-hidroflavonol, no entanto, os elagitaninos caracterizados pelo ácido elágico, ácido gálico e punicalagina são os fenólicos predominantes do fruto (CERDA et al., 2003). Os principais componentes anti-inflamatórios presentes na casca do fruto são punicalagina, punicalina, estrictinina A e granatina B que atuam reduzindo significativamente a produção de óxido nítrico e PGE2 (Prostaglandinas E2) por inibição da expressão de proteínas pró-inflamatórias (LEE et al., 2008). O efeito antimicrobiano, por sua vez é atribuído à ação que esses componentes têm sobre a membrana plasmática do microrganismo (ISMAIL et al., 2012). Sugerimos que essas características do extrato somadas ao seu efeito modulador possam ter garantido a sobrevivência dos animais sépticos tratados.

Levando em consideração que a sepse é desencadeada por um processo infeccioso, a primeira medida, após o diagnóstico ou suspeita, está relacionada ao uso de antimicrobianos de amplo espectro, com intuito de controlar ou erradicar o foco primário da infecção (HOTCHKISS et al., 2016). A importância dos antimicrobianos apropriados nos estágios iniciais tem sido bem reconhecida, uma vez que reduz significativamente o risco de mortalidade (KUMAR et al., 2009), no entanto é cada vez mais frequente a identificação de microrganismos multirresistentes como agentes etiológicos da sepse (DERMENGIU et al., 2013). Nesse sentido, as espécies vegetais ganham importante destaque como promissora alternativa na busca de novas terapias antimicrobianas.

Nesse aspecto, destacamos uma potencial atividade antimicrobiana *in vivo* de *P. granatum* com abrangência local e sistêmica, uma vez que garantiu o controle da proliferação bacteriana no foco principal da infecção (cavidade peritoneal) e também no sangue, baço e lavado bronco alveolar, pois preveniu a disseminação sistêmica e consequente acometimento de regiões

distantes do foco infeccioso. Pai e colaboradores (2011) afirmaram, através de um estudo *in vitro*, que *P. granatum* apresenta atividade antimicrobiana frente a espécies de bactérias enteropatogênicas. Em nosso estudo, pudemos demonstrar que *P. granatum* apresenta ação antimicrobiana, *in vivo*, contra bactérias do trato digestório expostas à cavidade peritoneal por meio do modelo de CLP. Em adição aos testes de ação antimicrobiana, Setiadhi e colaboradores (2017) verificaram também que, mesmo em elevada concentração (160mg/kg) o extrato de *P. granatum* não apresentou toxicidade aguda em camundongos de linhagem Swiss, a mesma utilizada por esta equipe.

Além de ter ação direta sobre o patógeno, *P. granatum* estimula o influxo de células para o local de injúria ou foco infeccioso o que é de grande importância em processo inflamatório/infeccioso como a sepse. No presente estudo ocorreu aumento de neutrófilos na cavidade peritoneal dos animais sépticos e o grupo tratado, além de apresentar quantidade elevada de neutrófilos, apresentou aumento do número de macrófagos e linfócitos em relação ao grupo não tratado. Os neutrófilos desempenham um importante papel no controle da infecção, pois possuem a característica de liberar enzimas proteolíticas e produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio, por exemplo, substância com elevado potencial microbicida (BROWN et al., 2006; KRUGER et al., 2015).

O aumento na produção de ERO pode ocorrer, no início do desenvolvimento da sepse, devido ao *burst* oxidativo causado, dentre outros motivos, pelo estímulo fornecido através do reconhecimento de endotoxinas pelos macrófagos e outros fagócitos, que produzem ERO para eliminar patógenos (DESSAUER et al., 2011). Embora o extrato tenha proporcionado o aumento de células produtoras de ERO, os resultados do ensaio com peróxido de hidrogênio demonstram que esta produção acontece de forma controlada, pois quando há o estímulo com PMA, o percentual e o MFI de peróxido de hidrogênio se tornam semelhantes à produção espontânea. Esse fato é de extrema importância para a prevenção de danos e injúrias teciduais, que levam ao agravamento do quadro clínico.

Vítor e De La Fuente (2003) sugerem que os leucócitos peritoneais contribuem para o estresse oxidativo produzido por endotoxinas como LPS através da produção de ROS e liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 no peritônio. Em nosso estudo, no contexto da sepse, *P. granatum* proporcionou aumento dos níveis séricos de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-6, e da quimiocina MCP-1, como provável consequência do

aumento de macrófagos na cavidade peritoneal. Entretanto, o extrato também promoveu o aumento de níveis séricos da citocina reguladora IL-10.

Durante um processo infeccioso é esperado a liberação de grande quantidade de citocinas inflamatórias como forma de sinalização da necessidade de intensa migração celular para o local da infecção de modo a controlar a proliferação do agente infeccioso. Entretanto, uma resposta inflamatória exacerbada pode gerar danos celulares e tissulares, que agravarão o quadro clínico da doença. Estudos *in vitro* sugerem que IL-10 suprime a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ (SCHULTE, et al., 2013). Os resultados obtidos com o tratamento indicam que a elevada produção de IL-10 tenha controlado o balanceamento entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e contribuído para a sobrevivência dos animais tratados. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Kato e colaboradores (1995) e Van Der Pool e colaboradores (1995) onde o bloqueio de IL-10 endógena estava associada ao aumento da mortalidade de animais sépticos.

Também foram detectados altos níveis da citocina IL-6 que é caracterizada por desempenhar importante função em ambas as respostas anti e pró-inflamatória (Schulte et al., 2013). A ação anti-inflamatória da IL-6 está relacionada à diminuição da liberação de agentes pró-inflamatórios como TNF- α e IL-1 (Schindler et al., 1989). Além disso, curiosamente, detectamos baixos níveis de IFN- γ , uma citocina inflamatória comum em processos de infecção, inclusive em casos de sepse. Entretanto, sabe-se que essa citocina é produzida pela ativação de células NK, Th1 e células T citotóxicas (Schulte et al., 2013) que, neste estudo se apresentaram em pequenas quantidades. Hipotenzamos que a baixa quantidade de IFN- γ pode estar relacionada ao curto espaço de tempo que os animais permaneceram em estado séptico (aproximadamente 12 horas). Schulte e colaboradores (2013) também afirmam que os níveis dessa citocina no plasma não estão diretamente relacionados com a severidade ou mortalidade na sepse.

Com o intuito de verificar o efeito de *P. granatum* nos órgãos linfoides secundários e foco infeccioso, avaliamos o fenótipo celular nos linfonodos mesentéricos, baço e peritônio. No baço o tratamento proporcionou aumento da ativação de células apresentadoras de antígenos, em especial das células dendríticas. Embora não tenha sido observada alteração no percentual total de células do linfonodo, também ocorreu aumento de células dendríticas ativadas neste local, mesmo que em um baixo percentual. Flohé e colaboradores (2006) destacam que, durante a

sepsse, as células dendríticas atingem a maturação com maior rapidez, característica que foi ainda mais acentuada com o tratamento com *P. granatum* proporcionando, portanto, células com maior capacidade de reconhecer e apresentar um antígeno.

Por meio da imunofenotipagem foi possível verificar que o tratamento beneficia os animais tendenciando ao aumento do número de macrófagos ao mesmo tempo que aumenta a quantidade de linfócitos T helper, na região peritoneal, proporcionando melhores condições para o reconhecimento e apresentação de antígenos entre as essas células. Os linfócitos T helper ativados desempenham importante função de secreção de citocinas como IFN- γ que, por sua vez, ativam células fagocíticas e células B que produzem anticorpos contra o patógeno (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011). Curiosamente, o extrato também foi capaz de aumentar a expressão de MHC-II, presente em APCs possibilitando, dessa maneira, a eficiente identificação e apresentação dos antígenos. A diminuição dos linfócitos CD8⁺CD69⁺ (linfócitos T citotóxicos ativados) é esperada, uma vez que a infecção é polimicrobiana, com antígenos de superfície, causada pela perfuração cecal e não uma infecção intracelular.

É notória a ampla e diversificada gama de atuações e possibilidades desempenhadas pelo EBPg, o que desperta interesse para o grande potencial terapêutico e biotecnológico que possui (SILVA et al., 2013). A combinação das ações antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e imunomoduladora tornam o EBPg um promissor caminho terapêutico em quadros de sepsse. Em conclusão, demonstramos que *P. granatum* apresenta grande potencial no tratamento de camundongos induzidos com sepsse letal polimicrobiana. Ela atua tanto diretamente, através da inibição do agente infeccioso, quanto indiretamente, por meio da estimulação do sistema imune em manter a resposta inflamatória controlada. Esses dois fatores em conjunto são as características diferenciais e ideais para fármacos utilizados no tratamento da sepsse, uma vez que a maioria dos antibióticos utilizados atuam apenas nos microrganismos e não garantem a restauração da homeostase do paciente.

7 CONCLUSÃO

Podemos inferir com os resultados obtidos por nossa equipe, que o EBPg apresenta um alto potencial imunomodulador, atuando melhor que o antibiótico de uso padrão na sobrevida dos animais, controlando a inflamação sistêmica. A espécie vegetal *Punica granatum* L. ocasionou diminuição de neutrófilos e aumento de linfócitos no sangue periférico, controle da produção de peróxido de hidrogênio e da inflamação através da liberação, em altas quantidades, da citocina reguladora IL-10. O efeito imunomodulador representa uma atividade indiscutível e requerida para o aumento de sobrevida nos quadros de sepse. Além disso, a *P. granatum* apresentou efetivo efeito antimicrobiano *in vivo* frente bactérias do trato digestivo e de áreas distantes do foco infeccioso como sangue periférico, pulmão e baço de animais sépticos, demonstrando a ação sistêmica do extrato. Diante disso, demonstramos o elevado potencial terapêutico, no contexto de sepse, que o produto natural de origem vegetal derivado de *Punica granatum* apresenta, como uma importante via alternativa ou suplementar de tratamento.

8 REFERÊNCIAS

- ALVES-FILHO J.C. BENJAMIM, C., TAVARES-MURTA, B. M., & CUNHA, F. Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Brasil, v. 100, nº 1, p. 223-226, 2005.
- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International journal of food microbiology**, v. 134, nº 3, p. 244-248, 2009
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, nº 9, p. 840-851, 2013.
- ASSAF, A. M.; AMRO, B. I.; MASHALLAH, S.; HADDADIN, R. N, Antimicrobial and anti-inflammatory potential therapy for opportunistic microorganisms. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, nº 5, p. 494-505, 2016.
- BAKER, C.C. CHAUDRY, I. H., GAINES, H. O., BAUE, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine caecal ligation and puncture model. **Surgery**. v. 94, nº 2, p. 331-335, 1983.
- BARROQUEIRO, E. S. B., PRADO, D. S., BARCELLOS, P. S., SILVA, T. A., PEREIRA, W. S., SILVA, L. A., MACIEL, M. C. G., BARROQUEIRO, R. B., NASCIMENTO, F. R. F., GONÇALVES, A. G., GUERRA, R. N. M. Immunomodulatory and Antimicrobial Activity of Babassu Mesocarp Improves the Survival in Lethal Sepsis. **Evidence-Based Complementary and 342Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-7, 2016.
- BENJAMIM, C. F. SILVA, J. S., FORTES, Z. B., OLIVEIRA, M. A., FERREIRA, S. H., & CUNHA, F. Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect. Immun.** São Paulo, Brasil, v. 70, nº 7, p. 3602-3610, 2002.
- BENJAMIM, C. F., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Role of oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infec. Dis.** São Paulo, Brasil, v. 182, nº 1, p. 214-223, 2000.
- BENOIT, M., DESNUES, B., MEGE, J. L. Macrophage polarization in bacterial infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, nº 6, p. 3733-3739, 2008.
- BETANZOS-CABRERA, G.; MONTES-RUBIO, P. Y., FABELA-ILLESCAS, H. E., BELEFANT-MILLER, H., CANCINO-DIAZ, J. C. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. **Food & nutrition research**, v. 59, nº 1, p. 1-9, 2015.
- BONE, R. C., BALK, R. A., CERRA, F. B., DELLINGER, R. P., FEIN, A. M., KNAUS, W. A., SCHEIN, R. M. H., SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, nº 6, p. 1644-1655, 1992.
- BOSMANN, M.; WARD, P. A. The inflammatory response in sepsis. **Trends in immunology**, v. 34, nº 3, p. 129-136, 2013.

- BROWN, K. A., BRAIN, S. D., PEARSON, J. D., EDGEWORTH, J. D., LEWIS, S. M., TREACHER, D. F., Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**, v. 368, n° 9530, p. 157-169, 2006.
- BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n° 10, p. 854-865, 2005.
- BURKOVSKIY, I. SARDINHA, J., ZHOU, J., LEHMANN, C. Cytokine release in sepsis. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Canadá, v. 4, n° 9, p. 860-865, 2013.
- CERDÁ, B., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., ESPÍN, J. C. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n° 11, p. 3493-3501, 2003.
- CHAN, J. K., ROTH, J., OPPENHEIM, J. J., TRACEY, K. J., VOGL, T., FELDMANN, M., HORWOOD, N., NANCHAHAL, J. Alarmins: awaiting a clinical response. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n° 8, p. 2711-2719, 2012.
- CHEN, Y.; JUNGER, W. G. Measurement of oxidative burst in neutrophils. **Leucocytes: Methods and Protocols**, p. 115-124, 2012
- DAHAM, S. S., ALI, M. N., TABASSUM, H., KHAN, M. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci**, v. 9, n° 3, p. 273-281, 2010.
- DELLINGER, R. P., LEVY, M. M., RHODES, A., ANNANE, D., GERLACH, H., OPAL, S. M., SEVRANSKY, J. E.; SPRUNG, C. L.; DOUGLAS, I.S.; JAESCHKE, R.; OSBORN, T. M.; NUNNALLY, M. E.; TOWNSEND, S. R.; REINHART, K.; KLEINPELL, R. M.; ANGUS, D. C.; DEUTSCHMAN, C. S.; MACHADO, F. R.; RUBENFELD, G. D.; WEBB, S. A.; BEALE, R. J.; VINCENT JEAN-LOUIS, E MORENO, R.. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive care medicine**, v. 39, n° 2, p. 165-228, 2013.
- DERMENGIU, D., CURCA, G. C., CEAUSU, M., HOSTIUC, S. Particularities regarding the etiology of sepsis in forensic services. **Journal of forensic sciences**, v. 58, n° 5, p. 1183-1188, 2013.
- DESSAUER, B. V., BONGAIN, J., MOLINA, V., QUILODRÁN, J., CASTILLO, R., RODRIGO, R. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. **Journal of critical care**, v. 26, n° 1, p. 103-e1, 2011.
- ESPOSITO, S., DE SIMONE, G., BOCCIA, G., DE CARO, F., & PAGLIANO, P. Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 10, p. 204-212, 2017.
- FLEISCHMANN, C., SCHERAG, A., ADHIKARI, N. K., HARTOG, C. S., TSAGANOS, T., SCHLATTMANN, P., ... & REINHART, K. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 193, n° 3, p. 259-272, 2016.

FLOHE, S. B., AGRAWAL, H., SCHMITZ, D., GERTZ, M., FLOHE, S., SCHADE, F. U. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1- type immune response. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, nº 3, p. 473-481, 2006.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive care medicine**, v. 32, nº 12, p. 2077-2077, 2006.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HOTCHKISS, R. S., MOLDAWER, L. L., OPAL, S. M., REINHART, K., TURNBULL, I. R., & VINCENT, J. L. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16045, 2016.

ILAS. Sepse: um problema de saúde pública. 2ed. Instituto Latino-Americano de Saúde Publica (ILAS), Brasília; **CFM**, 2016

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, nº 2, p. 397-405, 2012.

JAFFER, U., WADE, R. G., GOURLAY, T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. **HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia**, v. 2, nº 3, p. 161, 2010.

JURENKA, J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. **Alternative medicine review**, v. 13, nº 2, p. 128, 2008.

KATO, T., MURATA, A., ISHIDA, H., TODA, H., TANAKA, N., HAYASHIDA, H., MONDEN, M., MATSUURA, N. Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, nº 6, p. 1336-1340, 1995.

KAWAI, T., AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, nº 5, p. 373, 2010.

KOBAYASHI S. D.; DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 1, nº 3, p. 309-333, 2009.

KRUGER, P., SAFFARZADEH, M., WEBER, A. N. R., RIEBER, N., RADSAK, M., BERNUTH, H. V., BENARAF, C., ROOS, D., SKOKOWA, J., HARTL, D. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS Pathog**, v. 11, nº 3, p. 1-23, 2015.

KUMAR, A., ELLIS, P., ARABI, Y., ROBERTS, D., LIGHT, B., PARRILLO, J. E., DODEK, P., WOOD, G.; KUMAR, A.; SIMON, D., PETERS, C., AHSAN, M.; CHATEAU, D.; AND THE COOPERATIVE ANTIMICROBIAL THERAPY OF SEPTIC SHOCK DATABASE RESEARCH GROUP. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. **Chest**, v. 136, nº 5, p. 1237-1248, 2009.

LEE, CHIA-JUNG, CHEN, L. G., LIANG, W. L., WANG, C. C. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linn. *in vitro* and *in vivo*. **Food chemistry**, v. 118, nº 2, p. 315-322, 2010.

LEE, S., KIM, B. S., KIM, K. S., LEE, S., SHIN, K. S., LIM, J. S. Immune-suppressive activity of punicalagin via inhibition of NFAT activation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 371, n° 4, p. 799-803, 2008.

LEPPER, P., HELD, T. K., SCHNEIDER, E., BÖLKE, E., GERLACH, H., TRAUTMANN, M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. **Intensive care medicine**, v. 28, n° 7, p. 824-833, 2002.

LEVY, M. M., FINK, M. P., MARSHALL, J. C., ABRAHAM, E., ANGUS, D., COOK, D., COHEN, J., OPAL, S. M., VINCENT, J. L., RAMSAY, G., 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. **Intensive care medicine**, v. 29, n° 4, p. 530-538, 2003.

LIBERIO, S. A., PEREIRA, A. L. A., DUTRA, R. P., REIS, A. S., ARAÚJO, M. J. A., MATTAR, N. S., Silva, L. A., Ribeiro, M. N. S., Nascimento, F. R. F., Guerra, R. N. M., MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n°1, p. 108, 2011.

MACHADO, J. L., ASSUNÇÃO, A. K. M., SILVA, M. C. P., REIS, A. S., COSTA, G. C., ARRUDA, D. S., ROCHA, B. A., VAZ, M. M. O. L. L., PAES, A. M. A., GUERRA, R. N. M., BERRETTA, A. A., NASCIMENTO, F. R. F. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

MACHADO, T. B.; LEAL, I. C., AMARAL, A. C. F., SANTOS, K., SILVA, M. G. D., & KUSTER, R. M. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* fruits. **J. Braz. Chem. Soc.** São Paulo, Brasil. v. 13, n° 5, p. 606-610, 2002.

MACIEL, M. C. G., FARIAS, J. C., MALUF, M. J., GOMES, E. A., PEREIRA, P. V. S., ARAGÃO-FILHO, W. C., FRAZÃO, J. B., COSTA, G. C., SOUSA, S. M., SILVA, L. A., AMARAL, F. M. M., RUSSO, M., GUERRA, R. N. M., NASCIMENTO, F. R. F., *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, São Paulo, Brasil, v. 8, n° 57, p. 1-7, 2008.

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

MAKLED, M. N., EL-AWADY, M. S., ABDELAZIZ, R. R., ATWAN, N., GUNS, E. T., GAMEIL, N. M., EL-DIN, A. B. S., AMMAR, E. M. Pomegranate protects liver against cecal ligation and puncture-induced oxidative stress and inflammation in rats through TLR 4/NF-κB pathway inhibition. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 43, p. 182-192, 2016.

MARTIN G. S., MANNINO, D. M., EATON, S., MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, Atlanta, USA, v. 348, n° 16, p. 1546-54, 2003.

MARTIN G. S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. Atlanta, USA, v. 10, n° 6, p. 701-706, 2012.

MATHEWS, M. T.; BERK, B. C. PARP-1 inhibition prevents oxidative and nitrosative stress-induced endothelial cell death via transactivation of the VEGF receptor 2. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, nº 4, p. 711-717, 2008.

MATOS, F. J. A. Descrição das plantas medicinais. In: __. Farmácias Vivas. Fortaleza: Editora UFC, 4ª ed. p. 216-217, 2002.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, nº 1, p. 4-11, 2014.

MCPHERSON D., GRIFFITHS, C., WILLIAMS, M., BAKER, A., KLODAWSKI, E., JACOBSON, B., DONALDSON, L. Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. **BMJ Open**, Londres, v. 3, nº 8, p. 1-7, 2013.

MICHELIN D. C., MORESCHI, P. E., LIMA, A. C., NASCIMENTO, G. G. F., PAGANELLI, M. O., CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, nº 4, p. 316-320, 2005.

MILLER L.S.; CHO J.S. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. **Nature Review Immunology**, California, USA, v. 11, nº 8, p. 505-518, 2011.

MOORTHY, K. PUNITHA, T., VINODHINI, R., SURESHKUMAR, B. T., VIJAYALAKSHMI, P., & THAJUDDIN, N. Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. (PERICARP), Índia, **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, nº 9, p. 474-479, 2013.

MOSSER, D. M., ZHANG, X. Interleukin- 10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological reviews**, v. 226, nº 1, p. 205-218, 2008.

NIJSTEN, M. W. N., HACK, C. E., HELLE, M., TEN DUIS, H. J., KLASSEN, H. J., AARDEN, L. A. Interleukin-6 and its relation to the humoral immune response and clinical parameters in burned patients. **Surgery**, v. 109, nº 6, p. 761-767, 1991.

NOLAN, A., WEIDEN, M., KELLY, A., HOSHINO, Y., HOSHINO, S., MEHTA, N., GOLD, J. A. CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 177, nº 3, p. 301-308, 2008.

OLIVEIRA L. P., PINHEIRO, R. C., VIEIRA, M. S., PAULA, J. R., BARA, M. T. F., & VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Goiás, Brasil, v. 20, nº 2, p. 201-207, 2010.

OLIVEIRA, R. A. G., **Hemograma: como fazer e interpretar**. São Paulo: editora LMP, 2007.

PADKIN, A., GOLDFRAD, C., BRADY, A. R., YOUNG, D., BLACK, N., e ROWAN, K. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. **Critical care medicine**, v. 31, nº 9, p. 2332-2338, 2003.

PAI, V., CHANU, T. R., CHAKRABORTY, R., RAJU, B., LOBO, R., BALLAL, M. Evaluation of the antimicrobial activity of *Punica granatum* peel against the enteric pathogens: an in vitro study. **Asian J Plant Sci Res**, v. 1, nº 2, p. 57-62, 2011.

PENG, Z., WANG, H. Z., SRISAWAT, N., WEN, X., RIMMELÉ, T., BISHOP, J., SINGBARTL, K., RAGHAVAN, M., KELLUM, J. A. Bactericidal antibiotics temporarily increase inflammation and worsen acute kidney injury in experimental sepsis. **Critical care medicine**, v. 40, nº 2, p. 538, 2012.

PEREIRA, J. V. Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre microrganismos do biofilme dental. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde. 2002.

PESSINI G. L., HOLETZ, F. B., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Paraná, Brasil, v. 13, nº 1, p. 21-24, 2003.

RAHIMI, H. R.; ARASTOO, M.; OSTAD, S. N. A comprehensive review of *Punica granatum* (pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 11, nº. 2, p. 385-400, 2012

RAY, W. A. MURRAY, K. T., HALL, K., ARBOGAST, P. G., STEIN, C. M. Azithromycin and the risk of cardiovascular death. **N. Engl. J. Med.**, Massachusetts, v. 366, nº 20, p. 1881-1890, 2012

RHODES, A., EVANS, L. E., ALHAZZANI, W., LEVY, M. M., ANTONELLI, M., FERRER, R., ... & ROCHWERG, B. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. **Intensive care medicine**, v. 43, nº 3, p. 304-377, 2017.

RICCI, D. GIAMPERI, L., BUCCHINI, A., FRATERNALE, D. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 310-312, 2006.

RIEDEMANN, N. C., GUO, R. F., WARD, P. A. The enigma of sepsis. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, nº 4, p. 460-467, 2003.

RIEDEMANN, N. C.; GUO, R. F.; WARD, P. A. The enigma of sepsis. **J. Clin. Invest.** Michigan, USA, v. 112, nº 4, p. 460-467, 2003.

RIOS, C. E., ABREU, A. G., BRAGA FILHO, J. A., NASCIMENTO, J. R., GUERRA, R. N., AMARAL, F. M., MACIEL, M. C. G., NASCIMENTO, F. R. *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Frontiers in microbiology**, v. 8, nº 148, p. 1-7, 2017.

RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.

SALES JÚNIOR, J. A. L.; DAVID, C. M.; HATUM, R.; SOUZA, P. C. S.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C. T.; FRIEDMAN, G.; DA SILVA, O. B.; DIAS, M. D.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; GRUPO DE ESTUDO DE SEPSE DO FUNDO AMIB; LUIZ, R. R. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, nº 1, p. 9-17, 2010.

SCHINDLER, R., MANCILLA, J., ENDRES, S., GHORBANI, R., CLARK, S. C., DINARELLO, C. A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1,

and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood**, v. 75, n° 1, p. 40-47, 1990.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

SCHULTZ, M. J., DUNSER, M. W., DONDORP, A. M., ADHIKARI, N. K., IYER, S., KWIZERA, A., ... & ANGUS, D. C. Current challenges in the management of sepsis in ICUs in resource-poor settings and suggestions for the future. **Intensive care medicine**, v. 43, n. 5, p. 612-624, 2017.

SETIADHI, R., SUFIAWATI, I., ZAKIAWATI, D., NUR'AENY, N., HIDAYAT, W., FIRMAN, D. R. Evaluation of antibacterial activity and acute toxicity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed ethanolic extracts in swiss webster mice. **Journal of Dentomaxillofacial Science**, v. 2, n° 2, p. 119-123, 2017.

SHAPIRO, H. LEV, S., COHEN, J., SINGER, P. Polyphenols in the prevention and treatment of sepsis syndromes: rationale and pre-clinical evidence. **Nutrition**, v. 25, n° 10, p. 981-997, 2009.

SILVA, E., DE ALMEIDA PEDRO, M., SOGAYAR, A. C. B., MOHOVIC, T., SILVA, C. L. O., JANISZEWSKI, M., CAL, R. G. R.; DE SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS J. D.; REZENDE, E. ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, Á.; ROCHA, P. C. S.; DE MATOS, G. F. J.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C. B. E KNOBEL, E. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n° 4, p. 251-260, 2004.

SILVA, J. A. T. RANA, T. S., NARZARY, D., VERMA, N., MESHAM, D. T., RANADE, S. A. Pomegranate biology and biotechnology: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 85-107, 2013.

SINGER, M., DEUTSCHMAN, C. S., SEYMOUR, C. W., SHANKAR-HARI, M., ANNANE, D., BAUER, M., BELLOMO, R.; BERNARD, G. R.; CHICHE, JEAN-DANIEL; COOPERSMITH, C. M.; HOTCHKISS, R. S.; LEVY, M. M.; MARSHALL, J. C.; MARTIN, G.S.; OPAL, S. M.; RUBENFELD, G. D.; VAN DER POLL, T.; VINCENT, JEAN-LOUIS; ANGUS, D. C. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n° 8, p. 801-810, 2016.

SINGH, S.; EVANS, T. W. Organ dysfunction during sepsis. **Intensive care medicine**, v. 32, n. 3, p. 349-360, 2006.

SOGAYAR, A. M., MACHADO, F. R., REA-NETO, A., DORNAS, A., GRION, C. M., LOBO, S. M., TURA, B. R., SILVA, C. L.O., CAL, R. G.R., BEER, I., MICHELS JR, V., SAFI JR, J., KAYATH, M., SILVA, E. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v. 26, n° 5, p. 425-434, 2008.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F.J. Biometry: The principle and practice of statistics. Biological Research. 2 ed. New York: W. H. **Freeman and company**, 1996.

STEARNS-KUROSAWA, D. J., OSUCHOWSKI, M. F., VALENTINE, C., KUROSAWA, S., & REMICK, D. G. The pathogenesis of sepsis. **Annu. Rev. Pathol.** v. 6, p. 19–48, 2011.

STEENBERG, A., FISCHER, C. P., KELLER, C., MØLLER, K., PEDERSEN, B. K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 285, n° 2, p. 433-437, 2003.

TORIO, C. M., ANDREWS, R. M. National inpatient hospital costs: the most expensive conditions by payer, 2011: **HCUP Statistical Brief** #160, 2013.

UNSINGER, J., MCGLYNN, M., KASTEN, K. R., HOEKZEMA, A. S., WATANABE, E., MUENZER, J. T., MCDONOUGH, J. S., TSCHOEP, J., FERGUSON, T. A., MCDUNN, J. E., MORRE, M., HILDEMAN, D. A., CALDWELL, C. C., HOTCHKISS, R. S. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. **The Journal of immunology**, v. 184, n° 7, p. 3768-3779, 2010.

VAN DER POLL, T., MARCHANT, A., BUURMAN, W. A., BERMAN, L., KEOGH, C. V., LAZARUS, D. D., NGUYEN, L., GOLDMAN, M., MOLDAWER, L. L., LOWRY, S. F. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **The Journal of Immunology**, v. 155, n° 11, p. 5397-5401, 1995.

VIANNA, R. C., GOMES, R. N., BOZZA, F. A., AMÂNCIO, R. T., BOZZA, P. T., DAVID, C. M., CASTRO-FARIA-NETO, H. C. Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: impact on cytokines and endotoxin release. **Shock**, v. 21, n° 2, p. 115-120, 2004.

VICTOR, V. M., DE LA FUENTE, M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. **Physiol Res**, v. 52, n° 6, p. 789-796, 2003.

VINCENT, J. Emerging therapies for the treatment of sepsis. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 28, n° 4, p. 411-416, 2015.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n° 2, p. 189-201, 1980.

WIERSINGA, W. J., LEOPOLD, S. J., CRANENDONK, D. R., VAN DER POLL, T. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n° 1, p. 36-44, 2014.

WILHELMS, S. B., HUSS, F. R., GRANATH, G., E SJÖBERG, F. Assessment of incidence of severe sepsis in Sweden using different ways of abstracting International Classification of Diseases codes: difficulties with methods and interpretation of results. **Critical care medicine**, v. 38, n° 6, p. 1442-1449, 2010.

YAMASHIRO S., KAMOHARA, H., WANG, J. M., YANG, D., GONG, W. H., YOSHIMURA, T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. **Journal of Leukocyte Biology**, Maryland, USA, v. 69, n° 5, p. 698-704, 2001.

ZIMMERMAN, J. E., KRAMER, A. A., KNAUS, W. A. Changes in hospital mortality for United States intensive care unit admissions from 1988 to 2012. **Critical care**, v. 1, n° 2, R81, p. 1-9, 2013.

9 APÊNDICES

APÊNDICE - A

Resultados adicionais

Efeito do EBPg na imunofenotipagem de células do peritônio

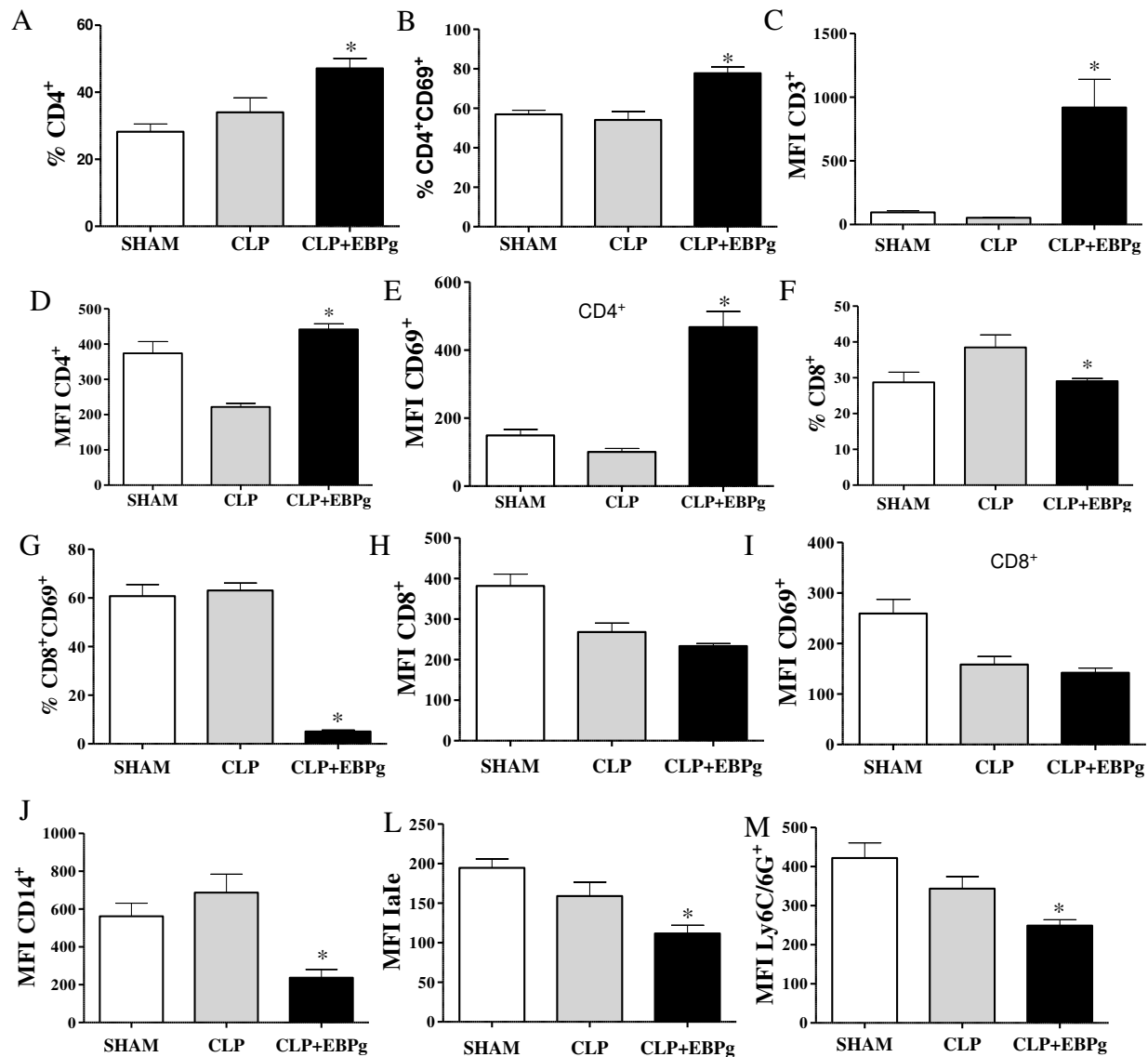


Figura 20. Resultados adicionais para a imunofenotipagem painel 1 das células do peritônio. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. (A) Percentual da subpopulação de linfócitos CD4⁺. (B) Percentual da molécula co-estimuladora CD69⁺. (C) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD3⁺. (D) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD4⁺. (E) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD69⁺. (F) Percentual da subpopulação de linfócitos CD8⁺. (G) Percentual da molécula co-estimuladora CD69⁺. (H) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD8⁺. (I) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células com molécula co-estimuladora CD69⁺ de células CD8⁺. (J) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD14⁺. (L) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células com expressão de Iαe. (M) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células com expressão de

Ly6C/6G. A diferença estatística significativa está representada por: *em relação ao grupo CLP. Os dados representam a média $\pm$ SEM adotando $p \leq 0,05$ como significância.

APÊNDICE - B

Efeito do EBPg na imunofenotipagem de células do linfonodo

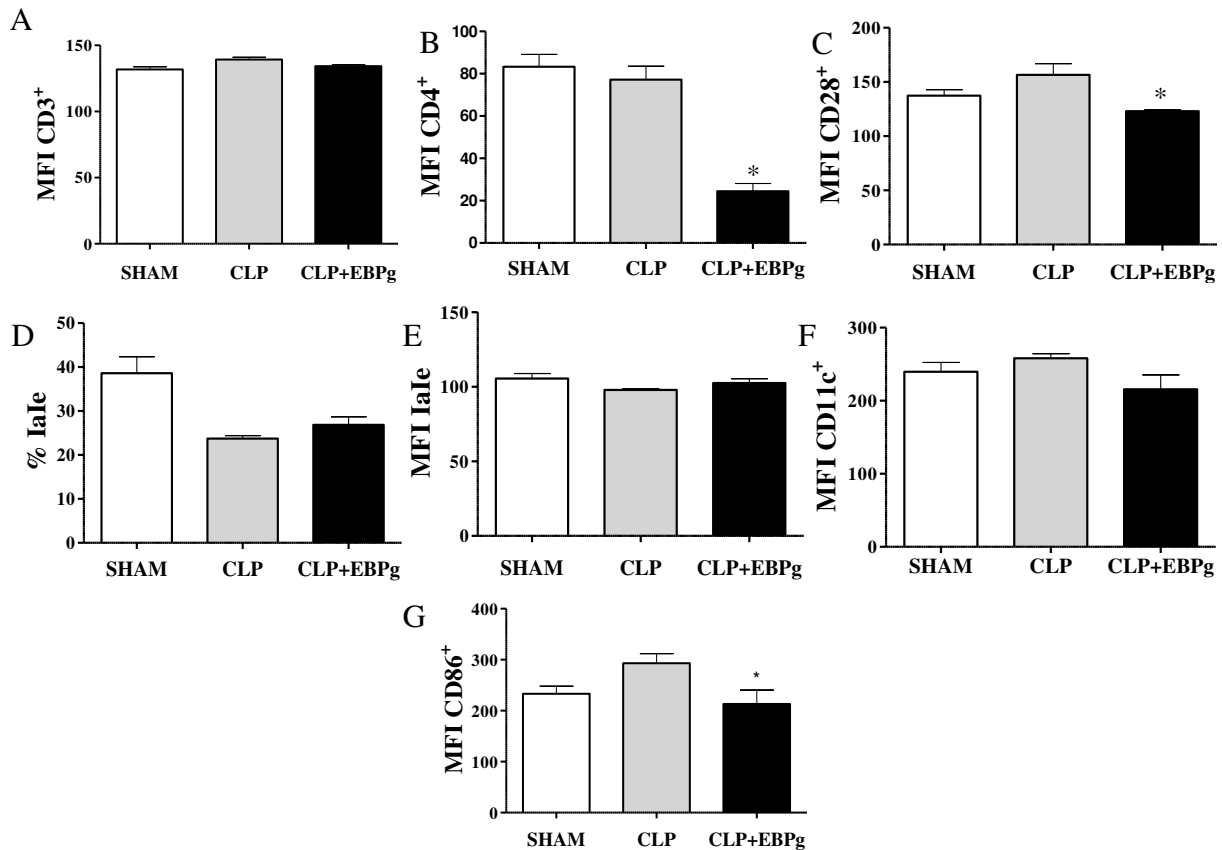


Figura 21. Resultados adicionais para imunofenotipagem dos linfonodos mesentéricos. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. (A) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD3⁺. (B) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD4⁺. (C) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de molécula co-estimuladora CD28⁺. (D) Percentual da expressão de IaIe. (E) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de IaIe. (F) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD11c⁺. (G) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células com molécula co-estimuladora CD86⁺. A diferença estatística significativa está representada por: *em relação ao grupo CLP. Os dados representam a média $\pm$ SEM adotando $p \leq 0,05$ como significância.

APÊNDICE - C

Efeito do EBPg na imunofenotipagem de células do baço

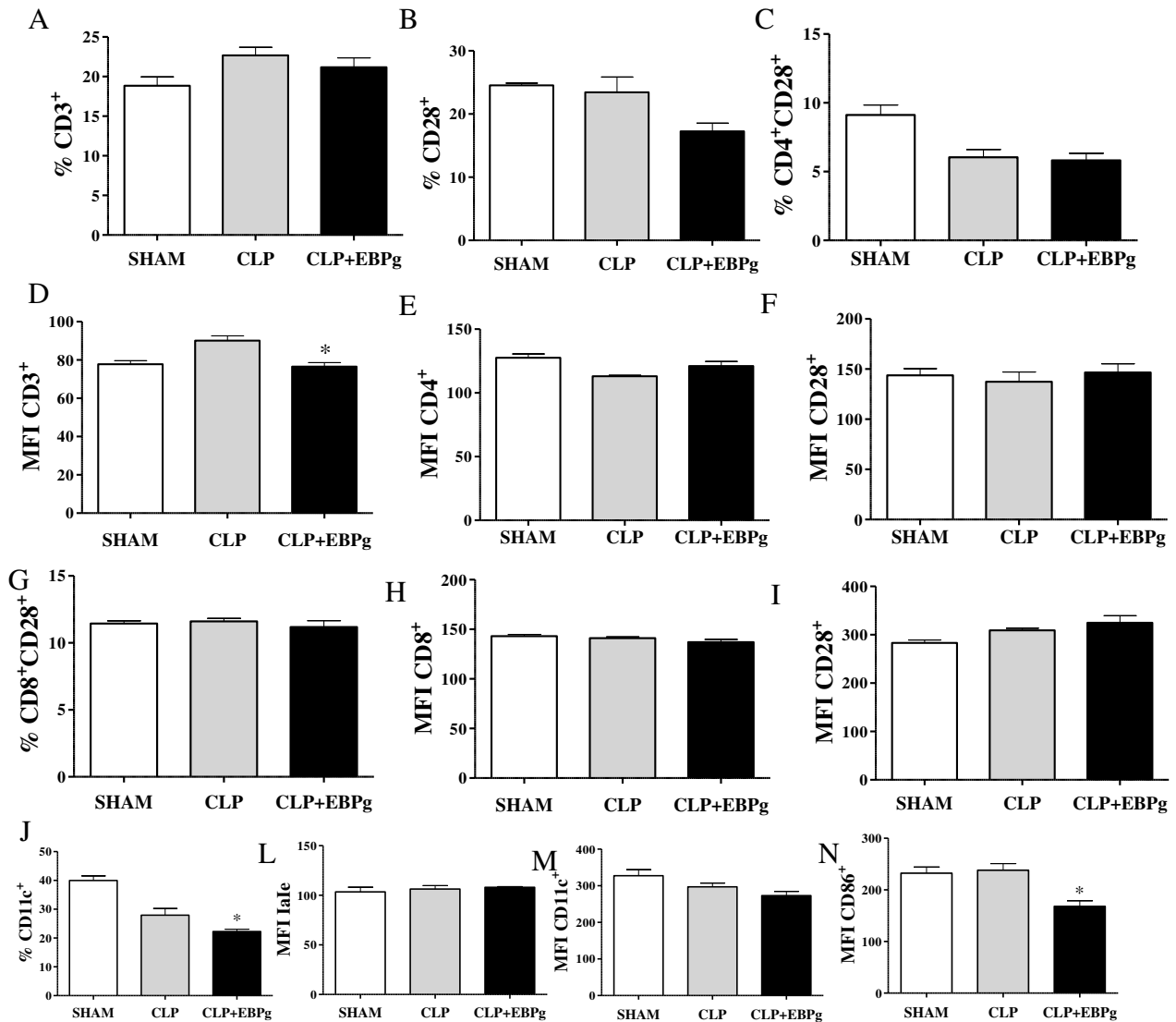


Figura 22. Resultados adicionais para imunofenotipagem de células do baço. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: SHAM – animais que passaram pelo processo cirúrgico, mas sem perfuração do ceco e sem tratamento, CLP – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, sem tratamento e CLP+EBPg – animais que tiveram indução de sepse por ligadura e perfuração cecal, com tratamento. (A) Percentual de linfócitos CD3⁺. (B) Percentual da molécula co-estimuladora CD28⁺. (C) Percentual de células duplo positivas CD4⁺CD28⁺. (D) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD3⁺. (E) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD4⁺. (F) Média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula co-estimuladora CD28⁺. (G) Porcentagem de células duplo positivas CD8⁺CD28⁺. (H) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD8⁺. (I) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de molécula co-estimuladora CD28⁺. (J) Percentual de células CD11c⁺. (L) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de IaIe. (M) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células CD11c⁺. (N) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células com molécula co-estimuladora CD86⁺. A diferença estatística significativa está representada por: *em relação ao grupo CLP. Os dados representam a média ± SEM adotando p ≤ 0,05 como significância.

APÊNICE - D

ARTIGO

Punica granatum L. Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis

Liana d. Trovão¹, Patricia C. Alves¹, Aluisio d. Oliveira¹, Cesar A. Cuzcano¹, Luis V. Moura¹, André A. Vale¹, Ana Paula S. Santos¹, Paulo Vitor S. Pereira¹, Rosane N. Guerra¹, Flávia R. Nascimento¹, Lucilene A. Silva¹, Andresa A. Berretta², MÁRCIA CRISTINA G. MACIEL^{1*}

¹Universidade Federal do Maranhão, Brazil, ²Apis Flora (Brazil), Brazil

Submitted to Journal:

Frontiers in Immunology

Specialty Section:

Microbial Immunology

Article type:

Original Research Article

Manuscript ID:

423366

Received on:

05 Sep 2018

Frontiers website link:

www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

LT, PA, FN, PP and MM. Performed the experiments: LT, PA, AO, CC, LM, AV and MM. Analyzed the data: LT, PA, and MM. Contributed reagents/materials/analysis tools: RG, FN, AS, LS, PP and AB. Wrote the paper: LT, PA, FN, PP and MM.

Keywords

systemic inflammation, lethal sepsis, natural product, Infection Control, Punica granatam

Abstract

Word count: 297

Sepsis is a syndrome in which there is an imbalance between anti and pro-inflammatory responses leading to systemic effects. Natural products have been shown to be good alternatives to control sepsis development. Punica granatum L., known as pomegranate, presents anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant properties. The aim of this work was to evaluate the possible immunomodulatory effect of the Hydroalcoholic Crude Extract from the bark of Punica granatum fruits (HCEPg) in septic mice. It was used the lethal polymicrobial sepsis induced in Swiss mice by Cecal Ligation and Perforation (CLP). Initially, animals were shared into 3 groups: CLP, ATB and HCEPg concomitant (treated, 5mg/kg, immediately after CLP). All treatments were done by subcutaneous (SC) route and single dose. It was verified that animals treated with HCEPg presented a significant increase in survival. Then, to evaluate the immunomodulatory effect of HCEPg animals were shared into 3 groups: SHAM, CLP and HCEPg concomitant. The animals received saline or HCEPg (5mg/kg, SC), immediately after induction of sepsis. Twelve hours after CLP, blood was collected to measure serum cytokines and animals were euthanized for colony-forming units (CFUs) counting, and analyze of peritoneal cells influx, activation and immunophenotyping. The results showed that HCEPg treatment inhibited bacterial growth in the peritoneum, blood and, spleen. Besides, it decreased ex vivo hydrogen peroxide secretion by phagocytes. However, it increased cytokines in serum, especially regulatory IL-10, indicating a systemic anti-inflammatory effect. In addition, increased cellular influx, especially of phagocytes, to infectious focus. Histopathological analysis of lungs revealed absence necrosis, edema and cellular infiltration, but there was a reduction of hemorrhage. In conclusion, P. granatum acts directly on the infectious agent and regulates the immune system to control inflammatory response, protecting against cell damage and promoting the restoration of homeostasis in septic animals.

Keywords: Inflammation; Infection; Pomegranate; Immunomodulation

Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: Yes

Please provide the complete ethics statement for your manuscript. Note that the statement will be directly added to the manuscript file for peer-review, and should include the following information:

- Full name of the ethics committee that approved the study
- Consent procedure used for human participants or for animal owners
- Any additional considerations of the study in cases where vulnerable populations were involved, for example minors, persons with disabilities or endangered animal species

As per the Frontiers authors guidelines, you are required to use the following format for statements involving human subjects: This study was carried out in accordance with the recommendations of [name of guidelines], [name of committee]. The protocol was approved by the [name of committee]. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

For statements involving animal subjects, please use:

*This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee'.
The protocol was approved by the 'name of committee'.*

If the study was exempt from one or more of the above requirements, please provide a statement with the reason for the exemption(s).

Ensure that your statement is phrased in a complete way, with clear and concise sentences.

This study was carried out in accordance with the recommendations of Ethics Committee on Animal Experimentation.
The approval protocol number is 23115.002346/2015-45

In review

***Punica granatum* L. Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis**

Liana de O. Trovão^{1,2}, Patrícia C. S. Alves^{1,2}, Aluisio da S. Oliveira^{1,2}, Cesar A. S. Cuzcano⁴, Luís V. M. de Moura⁴, André A. M. Vale^{1,2}, Ana Paula S. A. dos Santos^{1,2}, Paulo V. S. Pereira^{1,2}, Rosane N. M. Guerra^{1,2}, Flávia R. F. Nascimento^{1,2}, Lucilene A. Silva^{1,2}, Andresa A. Berretta³, Márcia C. G. Maciel^{1,2,4}.

¹Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil, ³Apis Flora Industrial and Comercial Ltda., ⁴Research Laboratory in Immunopathology, Federal University of Maranhão, Pinheiro, Brazil.

Márcia C. G. Maciel / e-mail: macielmcg@gmail.com

ABSTRACT

Sepsis is a syndrome in which there is an imbalance between anti and pro-inflammatory responses leading to systemic effects. Natural products have been shown to be good alternatives to control sepsis development. *Punica granatum* L., known as pomegranate, presents anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant properties. The aim of this work was to evaluate the possible immunomodulatory effect of the Hydroalcoholic Crude Extract from the bark of *Punica granatum* fruits (HCEPg) in septic mice. It was used the lethal polymicrobial sepsis induced in Swiss mice by Cecal Ligation and Perforation (CLP). Initially, animals were shared into 3 groups: CLP, ATB and HCEPg concomitant (treated, 5mg/kg, immediately after CLP). All treatments were done by subcutaneous (SC) route and single dose. It was verified that animals treated with HCEPg presented a significant increase in survival. Then, to evaluate the immunomodulatory effect of HCEPg animals were shared into 3 groups: SHAM, CLP and HCEPg concomitant. The animals received saline or HCEPg (5mg/kg, SC), immediately after induction of sepsis. Twelve hours after CLP, blood was collected to measure serum cytokines and animals were euthanized for colony-forming units (CFUs) counting, and analyze of peritoneal cells influx, activation and immunophenotyping. The results showed that HCEPg treatment inhibited bacterial growth in the peritoneum, blood and, spleen. Besides, it decreased *ex vivo* hydrogen peroxide secretion by phagocytes. However, it increased cytokines in serum, especially regulatory IL-10, indicating a systemic anti-inflammatory effect. In addition, increased cellular influx, especially of phagocytes, to infectious focus. Histopathological analysis of lungs revealed absence necrosis, edema and cellular infiltration, but there was a reduction of hemorrhage. In conclusion, *P. granatum* acts directly on the infectious agent and regulates the immune system to control inflammatory response, protecting against cell damage and promoting the restoration of homeostasis in septic animals.

Keywords: systemic inflammation, lethal sepsis, natural product, infection control, *Punica granatum*

INTRODUCTION

Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. The clinical criteria for sepsis include suspected or documented infection and two or more Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) points for organ dysfunction. Septic shock is defined as a subset of sepsis in which underlying circulatory and

cellular/metabolic abnormalities are profound enough to increase mortality substantially (Napolitano, 2018). In the early state of sepsis, the excessive activation of the antigen recognition system and the release of pro-inflammatory mediators lead to serious multi-system dysfunction in the body (Chen et al., 2011).

During the infection process, the number of neutrophils increases near the capillary venules, they cross the endothelial barrier by diapedese and reach the infected area. Therefore, they are capable of amplifying the inflammatory response, eliminating the microorganisms by the release of bactericide agents, as reactive oxygen and nitrogen species. Besides, the release of cytokines and chemokines by phagocytes, increase the recruiting and the activation of these and other immunological cells (Yamashiro et al., 2001; McDonald, 2017).

During sepsis occurs the release of inflammatory mediators, as pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17, and tumor necrosis factor α (TNF- α), and anti-inflammatory proteins IL-4, IL-10, IL-13 and transforming growth factor β (TGF- β), that often acts to re-establish homeostasis of immunologic system (Burkovskiy et al., 2013).

Sepsis is a challenge both to scientists and to clinical professionals for being one of the main causes of morbidity and mortality of hospitalized patients and immunosuppressed individuals (Mcpherson et al., 2013; Mayr et al., 2014). Usually, patients are treated with antimicrobials that can cause cardiovascular alterations, as major side effects (Ray et al., 2012), besides increasing inflammation by bacterial endotoxins release and acute renal injury (Peng et al., 2012). Therefore, it is necessary to search for new interventions and treatments that help both in control of bacterial proliferation and reestablishment of patient immunologic system, in order to control the inflammatory process.

Considering the anti-inflammatory and antimicrobial effects of *Punica granatum* and the success achieved in previous studies, we assessed the effect of this natural product on sepsis induced by CLP. *Punica granatum* L. belongs to Punicaceae family, it is commonly called pomegranate, and it has a wide territorial distribution (Oliveira et al., 2010). The empirical practice uses its leaves, stem, peel, and fruits in the treatment of a large number of infections and diverse inflammatory processes (Jurenka, 2008). It has as composition, great quantities of polyphenols, like tannin and flavonoids, to which it is possible to attribute anti-inflammatory (Lee et al., 2010; Marín et al., 2013), anti-microbial (Al-Zoreky, 2009; Pagliarulo et al., 2016) and anti-oxidant (Ricci et al., 2006; Legua et al., 2016) activities. Among the polyphenols present in the pomegranate peel the most abundant are the ellagitannins, among them punicalin, punicalagin and ellagic acid, and are intimately related to the anti-oxidant action (Sun et al., 2017). In addition, our research group has previously demonstrated that the ethanolic extract from *P. granatum* leaves presents significant biological activity in a murine model of asthma. This extract encapsulated in biodegradable microparticles has greater therapeutic potential than the extract in solution form (Oliveira et al., 2013).

In this article, we demonstrated that *P. granatum* presents a great potential in the treatment of lethal polymicrobial sepsis. The extract from the bark of *Punica granatum* fruits acts directly inhibiting the infectious agent, and also indirectly, through the stimulation of the immune system in keeping the inflammatory response controlled.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Female Swiss mice, 8 to 12 weeks of age and weighing on average 25 g, were used (n=5/group). The animals were obtained from the Central animal house of the Federal University of

Maranhão (São Luís, Brazil), maintained at 26±2 C, 44–56% relative humidity, under 12h light-dark cycles and had free access to sterile food and acidified water. All procedures have been assessed and approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Maranhão (Protocol: 23115.002346/2005-45).

Plant Material

The standard hydroalcoholic crude extract from the bark of *Punica granatum* fruits (HCEPg) was supplied by Apis Flora® and kept at room temperature until the moment of use. The preparation for use consists of the following steps: drying and resuspension of the dried material in Phosphate-buffered saline (PBS). HCEPg presented the following specifications: density = 0.929 g/mL; pH = 4.6; solids = 5.18% w/v; alcohol content = 50,0°GL; flavonoids = 1.92 mg/mL; total phenols (tannins) = 41.2 mg/mL.

Induction of sepsis

Polymicrobial sepsis was induced using CLP method described by Benjamim et al. (2001), with modifications in the anesthetic used. Initially, mice were anesthetized with 25 mg/kg ketamine hydrochloride and 20mg/kg xylazine hydrochloride according to Machado et al. (2012). Then, a laparotomy was performed, and the cecum was mobilized, ligated below the cecal valve, and punctured 10 times with 18-gauge needle to induce lethal sepsis. The cecum was placed back into the peritoneal cavity, and the abdomen was closed in two layers. Saline (0.5 mL/10 g body weight) was given subcutaneously to CLP animals for fluid resuscitation.

Experimental Design

Induction of sepsis by CLP method was used in all experiments. We used the 5mg/kg dose, subcutaneously, for the groups treated with the HCEPg. When necessary, we used Imipenem antibiotic at the dose 14mg/kg. For survival test, animals were divided into three groups (5/group): (1) CLP control group: CLP mice without treatment; (2) Positive control group: mice treated with antibiotic (Imipenem) immediately after induction of CLP; (3) Treatment (HCEPg concomitant) group: mice treated with HCEPg immediately after CLP. All animals were followed up for 5 days, with a record of death frequency every 12 hours. For experimental evaluation of cellular/immunological/functional parameters, animals were divided into three groups (5/group): SHAM; CLP mice without treatment; mice treated with HCEPg immediately after CLP. After 12h from the induction of CLP, the blood of anesthetized mice was collected. Mice were euthanized with an overdose of anesthetic (150 mg/kg ketamine hydrochloride and 120 mg/kg xylazine hydrochloride) (Rios et al., 2017).

Counting of Spleen, Bone Marrow, and Lymph Node Cells

After mice euthanasia, the femur, spleen and mesenteric lymph node were removed. The femur was perfused with 1mL of PBS for the isolation of bone marrow cells. The mesenteric lymph node was triturated with 1mL PBS. The spleen was triturated with 5mL PBS and passed through a silk sieve. Cells were stained with 0.05% Crystal Violet (in 30% acetic acid) counted using a bright-line Neubauer chambre (Sigma®) under a common light microscopy at 400X magnification.

Peritoneal Cell Harvesting and Counting

Mouse peritoneal cells were harvested by washing the peritoneal cavity with 5mL sterile ice-cold phosphate-buffered solution (PBS). Total cell numbers were estimated by counting cells

as described in the previous topic. Differential cell counts were determined by cytospin preparations stained with Instant-Prov (Newprov, Pinhais, Brazil; Nascimento et al., 2015).

Histological Analysis

For the histopathological analysis, lungs were fixed in 10% formol and embedded in paraffin. Next, 5 µm thick tissue sections were cut on a microtome, mounted on a slide and stained with hematoxylin and eosin. The slides were examined in a light microscope with 20, 40 and 100X objectives. The analysis parameters were hemorrhage, inflammatory infiltrate, necrosis and edema. Tissue changes were scored as 0 for absent, 1 for scarce, 2 for moderate and 3 for intense (Libério et al., 2011)

Colony-Forming Unit (CFU) Determination

For quantification of bacteria in blood, peritoneal lavage and spleen, 10µL of the exudate were collected and serially diluted in 96 well plates containing 90 µL of PBS in each well. Aliquots 100 µL of serial dilutions were plated on Brain Heart Infusion agar dishes (Difco Laboratories, Detroit) and seeded with Drigalski's handle. Colony-forming units (CFUs) were counted after overnight incubation at 37°C. The results were expressed in number of CFUs/mL (Rios et al., 2017).

Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Release

Hydrogen peroxide (H₂O₂) production was assessed by DHR (Dihydrorhodamine 123, Sigma®) assay. Peritoneal cavity cell suspension was counted and adjusted to a concentration of 1x10⁶/mL. Subsequently, these cells were labeled with DHR (Sigma®) (375ng/mL) for 10 minutes, at 37°C, and stimulated or not with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma®) (50nM) for 1h, at 37°C. After incubation with PMA, cells were placed in an ice bath for 10 minutes to quench all reactions. Subsequently, the cell suspension was washed with PBS, centrifuged at 4°C, and the reaction was read on a flow cytometer. The reading was made on channel FL-1, with complexity parameters (SSC) and cell size (FSC) defining the cell acquisition gate. For the analysis, 5000 events were acquired and later evaluated in software FlowJo (Tree Star Inc.) (Chen, Junger, 2012).

Immunophenotyping

After counting the peritoneal cavity cell, lymph node mesenteric and the spleen, 10⁶ cells/mL were resuspended and transferred to a plate of 96 well plate, marked with the specific antibody and incubated at 4°C for 15 minutes. Following incubation with Abs, cells were fixed in 1% paraformaldehyde (Fisher, Waltham, MA) before being analyzed using a Guava® flow cytometer. For analysis, 10000 events were acquired taking cell size (Forward Scatter, FSC) and cell complexity (Side Scatter, SSC) to establish acquisition gate followed by fluorescence channels analysis. Subsequently, data were processed on FlowJo v10.0 software (TREE STAR INC.). A proportion of up to 1% false-positive events were accepted in the isotype control samples. Results are expressed as percentage of cells expressing lymphocytes or phagocytes markers and mean fluorescence intensity (MFI).

Quantification of Cytokines

The cytometric bead array (CBA) technique was used for the quantification of TNF-α, MCP-1, IL-6, IL-10, IL-12 and IFN-γ in serum, as described by Maciel et al., (2014), using the Mouse inflammation cytokine kit (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA).

173 Statistical Analysis

174 Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The normality of data was evaluated
175 by the D'Agostino-Pearson test. Statistical analysis was performed using ANOVA followed by
176 Student's *t* test, using Graph Pad Prism software, version 5.0. The differences were considered
177 to be significant when $p \leq 0,05$. For survival of the mice was used the Kaplan-Meier curve, and
178 the log-rank statistical test was applied to compare the curves.

179 RESULTS

180 *Punica granatum* improves survival of septic mice

181 One hundred per cent of CLP mice died until the second day post CLP. The treatment performed
182 immediately after the induction of sepsis (concomitant) guaranteed survival of mice until the
183 fifth day. Importantly, the extract assured better survival than treatment with antibiotics (**Figure**
184 **1**).

185 *Punica granatum* decreases the number of CFUs

186 HCEPg concomitant treatment reduced the number of CFU in the peritoneum, blood and spleen,
187 when compared to the CLP group (**Figure 2**).

188 *Punica granatum* increases cell recruitment into the Peritoneal Cavity Induced by CLP

189 Considering the role of leukocytes in the control of bacterial growth, we performed total and
190 differential cell count in the peritoneal cavity. *Punica granatum* treatment increased the influx
191 of total cells when compared to the CLP group, what was related to an increase of macrophage
192 and lymphocytes counts (**Figure 3**).

193 *Punica granatum* reduces bleeding in the lung of septic animals

194 HCEPg treatment was found to be able to significantly reduce hemorrhage in lung. No statistical
195 difference was observed in the other parameters evaluated (**Table 1**).

196 Treatment with *Punica granatum* Induces Decrease in Hydrogen Peroxide (H₂O₂)

197 Considering the different effects observed in *Punica granatum* treatment, as augments on
198 cellular influx to the infectious site and control of bacterial growth, we analyzed the activation
199 of phagocytes using the ability to secrete hydrogen peroxide, important microbicide molecule.
200 Spontaneous H₂O₂ secretion was smaller in the *Punica granatum* group than in the CLP group
201 (both in percentage and in MFI). In addition, PMA decreased the H₂O₂ release in treated group
202 when compared with CLP group. (**Figure 4**).

203 Treatment with *Punica granatum* Induces Increase in Phagocytes and lymphocytes T 204 helper in the peritoneum and active dendritic cells in the spleen and lymph nodes in 205 immunophenotyping analysis

206 Immunophenotyping was performed to evaluate the phenotype presented by cells at the site of
207 infection. Treatment with *P. granatum* increased activated T helper lymphocytes (**Figure 5B**).
208 However, the treatment did not change significantly the amount of macrophages, but provided
209 an increasing tendency (**Figure 5A**). In the spleen, HCEPg was able to increase the percentage
210 of active antigen-presenting cells (**Figure 5C**) in particular activated dendritic cells (**Figure**

5D). In the lymph nodes, HCEPg treatment also increased activated dendritic cells IaIe⁺CD11c⁺CD86⁺ (Figure 5E) compared to CLP group.

***Punica granatum* induces the release of Cytokines**

After observation that treatment with *Punica granatum* modulates phagocyte response at the site of infection and considering that evolution of sepsis occurs in parallel to systemic inflammation, we investigate cytokines related to the progression of sepsis and phagocytes function. *Punica granatum* increased the production of IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , and IFN- γ . IL-12 was not detected in any of groups (Figure 6).

DISCUSSION

In the face of the presented results, the crude extract from the bark of the *Punica granatum* fruits presented a modulatory action in the immune system, activating phagocytes and lymphocytes in the infectious focus, also as a control to inflammatory responses due to the increase in IL-10 production and regulation of hydrogen peroxide release by peritoneal cells. Antimicrobial (Moorthy et al., 2013), anti-inflammatory (Lee et al., 2010) and anti-oxidant (Ricci et al., 2006) presented by the extract, together with the immunomodulation, might have guaranteed an increased survival to septic animals.

Many authors justify this antimicrobial action as a consequence to the presence of important phytochemical components in the crude extract, like polyphenols (tannins and flavonoids) with main emphasis to punicaline, pendunculagin, and punicalagin (Ismail et al., 2012). Dahham et al, (2010) evaluated antimicrobial activity of many parts of *P. granatum* against Gram-negative and Gram-positive bacteria, and fungi, demonstrating that the fruit peel is the part that presents the best direct microbicidal action. Pai et al, (2011) affirmed, through a study in vitro, that *P. granatum* presents antimicrobial activity against the enteropathogenic bacteria species.

Therefore, we pointed out a potential antimicrobial activity *in vivo*, with local and systemic protection. The extract controlled bacterial proliferation in the main focus of the infection (peritoneal cavity) and also in blood, spleen and bronchoalveolar lavage, preventing the dissemination to distant tissues from infection focus. In addition *in vitro* microbicide assays, Setiadhi et al., (2017) also verified that, even in elevated concentration (160mg/kg), *P.*

granatum extract did not present acute toxicity in Swiss mice, same lineage used in this work. In our study, *P. granatum* presented an *in vivo* antimicrobial action against gut bacteria in the CLP model.

Besides having direct effect on pathogens, *P. granatum* stimulates cellular to the infectious focus, very important in a model of lethal infection. In animals treated with *P. granatum*, the extract increased macrophages and lymphocytes numbers. As well was observed a sepsis-induced neutrophilia. Neutrophils perform an important role in infection control, because they have granules with proteolytic enzymes and produce reactive oxygen species (ROS), as hydrogen peroxide, substance with elevated microbicide activity (Brown et al, 2006; Kruger et al., 2015).

The elevated production of ROS, however, can generate exacerbated inflammation, cell death and even tissue damage (Crimi et al., 2006). Cells from animals treated with *P. granatum* maintain the hydrogen peroxide production, however in lower levels when compared to CLP mice cells. This role in reactive oxygen species release control is relevant to avoid microbial proliferation without generating tissue damage and, therefore, contributes to bring back the homeostasis to the immune system in the septic animal.

To verify the effect of *P. granatum* in the secondary lymphoid organs and infectious focus, we analyzed the cellular phenotype in lymph node, spleen and peritoneum. In the spleen, the treatment increased activation of antigen-presenting cells, especially dendritic cells (DC). In the lymph node, although an alteration in the total percentage has not been observed, it also occurred an increase in activated dendritic cells, even in a low percentage. Flohé et al (2006) highlighted that, during sepsis, dendritic cells reach maturation early in immune response. *P. granatum* treatment accentuated DC activation, even more, increasing the capacity of recognizing and presenting antigens.

The treatment benefits the animals, having a tendency to increase macrophages number and also the quantity of activated T helper lymphocytes, in the peritoneal region. Those changes in leukocyte cellularity probably proportionate better conditions to antigens recognition and presentation. The macrophages are between the main cells responsible for the releasing of pro-inflammatory mediators (Cavaillon & Adid-Conguy, 2005). During an infectious process, the releasing of a great quantity of inflammatory cytokines is one of the ways to control pathogens proliferation. However, an exacerbated inflammatory response can generate cell and tissue damage, which will worsen the clinical manifestations of the disease.

Macrophages are important cells in innate immunity and play a crucial role in response to microbial invasion, in the early phase of sepsis. Microbial products or Th1 cytokines polarize monocytes/macrophages to the M1 profile, which release pro-inflammatory cytokines/chemokines and are important to control bacterial proliferation. However, Th2-profile cells or cytokines polarize to M2 macrophages, which release anti-inflammatory cytokines/chemokines and contribute to tissue repair and remodeling (Sica et al., 2015).

The increase of peritoneal macrophages was important in the control of inflammatory response in the treated septic animals. Despite increased inflammatory cytokines, like TNF- α and IFN- γ , and MCP-1 chemokine, it was possible to detect elevated concentrations of regulatory cytokine IL-10, leading to the control of sepsis-related inflammatory response. Watanabe et al. (2016) found that, in the early stage of the sepsis, there is presence of M1 macrophages due to release of pro-inflammatory cytokines. However, they observed that, in the late phase of the syndrome, there is greater release of anti-inflammatory and regulatory cytokines, such as IL-10, stimulating the polarization of macrophages to M2. Thus, we relate the high level of IL-10 found in our results with the possibility of polarization of macrophages to M2 profile. High levels of cytokine IL-6, which is characterized by performing an important function in both responses anti and pro-inflammatory (Schulte et al., 2013), were also detected.

Besides that, we detected major levels of IFN- γ in treated animals, an inflammatory cytokine, common in infectious processes, including sepsis. Th1 cells, cytotoxic T cells and NK cells produce IFN- γ (Schulte et al., 2013). Those cells are intimately related with the activation and recruiting of other leucocytes, stimulating the elimination of the infectious agent (Stearns-kurosowa et al., 2011). Schulte et al (2013) also affirmed that some levels of IFN- γ in plasma are not directly related to the severity or mortality in sepsis.

In conclusion, we demonstrated that *P. granatum* presents a great potential in the treatment of lethal polymicrobial sepsis. The extract from the bark of *Punica granatum* fruits acts both directly, through the inhibition of the infectious agent, and indirectly, through the modulation of the immune system, keeping the inflammatory answer controlled. These two factors together are differential characteristics and ideal to drugs used in sepsis treatment, once the majority of antibiotics used act only in the microorganisms and do not assure the restoration of the patient homeostasis.

ETHICS STATEMENT

All procedures were authorized by the National Council for Animal Control and Experimentation (CONSEA) and approved by the Animal Use Ethics Committee of the UFMA under protocol number 23115.002346/2005-45.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: LT, PA, FN, PP and MM. Performed the experiments: LT, PA, AO, CC, LM, AV and MM. Analyzed the data: LT, PA, and MM. Contributed reagents/materials/analysis tools: RG, FN, AS, LS, PP and AB. Wrote the paper: LT, PA, FN, PP and MM.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Brazilian funding agencies FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento em Pesquisa), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support.

REFERENCES

- Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*. 134, 3, 244-248. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002
- Benjamim, C. F. (2001). Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Med. Ribeirão Preto* 34, 18–26.
- Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M., and Treacher, D. F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*. 368, 9530, 157-169. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69005-3
- Burkovskiy, I., Sardinha, J., Zhou, J., and Lehmann, C. (2013). Cytokine release in sepsis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4, 09, 860. doi:10.4236/abb.2013.49114
- Cavaillon, J. M., and Adib-Conquy, M. (2005). Monocytes/macrophages and sepsis. *Critical care medicine*. 33, 12, S506-S509. doi: 10.1097/01.CCM.0000185502.21012.37
- Chen Y., and Junger W.G. (2012) Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. In: Ashman R. (eds) *Leucocytes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 844. Humana Press. doi: 10.1007/978-1-61779-527-5_8
- Chen, X. H., Yin, Y. J., Zhang, J. X. (2011). Sepsis and immune response. *World journal of emergency medicine*, 2, 2, 88.
- Crimi, E., Sica, V., Slutsky, A. S., Zhang, H., Williams-Ignarro, S., Ignarro, L. J., and Napoli, C. (2006). Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction. *Free Radical Research*. 40, 7, 665-672. doi: 10.1080/10715760600669612
- Dahham, S. S., Ali, M. N., Tabassum, H., and Khan, M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Am.–Eurasian J. Agric. Environ. Sci*. 9, 273-281.
- de Oliveira, J. F., Garreto, D. V., da Silva, M. C., Fortes, T. S., de Oliveira, R. B., Nascimento, F. R., Da Costa, F. B.; Grisotto, M. A. G. and Nicolete, R. (2013). Therapeutic potential of biodegradable microparticles containing *Punica granatum* L.(pomegranate) in murine model of asthma. *Inflammation Research*, 62, 11, 971-980. Doi: 10.1007/s00011-013-0659-3
- Flohe, S. B., Agrawal, H., Schmitz, D., Gertz, M., Flohe, S., and Schade, F. U. (2006). Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type

- immune response. *Journal of leukocyte biology*. 79, 3, 473-481. doi: 10.1189/jlb.0705413.
- Ismail, T., Sestili, P., and Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of ethnopharmacology*. 143, 2, 397-405. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.004
- Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review*. 13, 2, 128.
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A. N., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., et al., (2015). Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogen*. 11, 3, e1004651. doi: 10.1371/journal.ppat.1004651
- Lee, C. J., Chen, L. G., Liang, W. L., and Wang, C. C. (2010). Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Food Chemistry*. 118, 2, 315-322. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.123
- Legua, P., Forner-Giner, M. Á., Nuncio-Jáuregui, N., & Hernández, F. (2016). Polyphenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of nineteen pomegranate fruits: A rich source of bioactive compounds. *Journal of Functional Foods*, 23, 628-636. Doi: 10.1016/j.jff.2016.01.043
- Liberio, S. A., Pereira, A. L. A., Dutra, R. P., Reis, A. S., Araújo, M. J. A., Mattar, N. S., ... & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 1, 108. Doi: 10.1186/1472-6882-11-108
- Machado, J. L., Assunção, A. K. M., da Silva, M. C. P., Reis, A. S. D., Costa, G. C., Arruda, D. D. S., Berretta, A. A. (2012). Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Maciel, M. C., Fialho, E. M., Guerra, R. N., Borges, V. M., Kwasniewski, F. H., and Nascimento, F. R. (2014). *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Toxicon* 89, 1-8. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.018
- Marín, M., Giner, R. M., Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. *Journal of ethnopharmacology*, 150, 3, 925-934. Doi: 10.1016/j.jep.2013.09.030
- Mayr, F. B., Yende, S., and Angus, D. C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 5, 1, 4-11. doi: 10.4161/viru.27372
- McDonald, B. (2017). Neutrophils in critical illness. *Cell and tissue research*, 371, 3, 607-615. Doi: 10.1007/s00441-017-2752-3
- McPherson, D., Griffiths, C., Williams, M., Baker, A., Klodawski, E., Jacobson, B., and Donaldson, L. (2013). Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. *BMJ open*. 3, 8, e002586. doi: 10.1136/bmjopen-2013-002586
- Moorthy, K., Punitha, T., Vinodhini, R., Sureshkumar, B. T., Vijayalakshmi, P., and Thajuddin, N. (2013). Antimicrobial activity and qualitative phytochemical analysis of *Punica granatum* Linn. (PERICARP). *Journal of Medicinal Plants Research*. 7, 9, 474-479. doi: 10.5897/JMPR12.953
- Napolitano, L. M. (2018). Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surgical infections*, 19, 2, 117-125. Doi: 10.1089/sur.2017.278

- Nascimento, F. R. F., Gomes, E. A., Russo, M., and Lepique, A. P. (2015). Interferon regulatory factor (IRF)-1 is a master regulator of the cross talk between macrophages and L929 fibrosarcoma cells for nitric oxide dependent tumoricidal activity. *PLoS ONE* 10:e0117782. doi: 10.1371/journal.pone.0117782
- Oliveira, L. P., Pinheiro, R. C., Vieira, M. S., Paula, J. R., Bara, M. T. F., Valadares, M. C. (2010). Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20, 2, 201-207.
- Pagliarulo, C., De Vito, V., Picariello, G., Colicchio, R., Pastore, G., Salvatore, P., & Volpe, M. G. (2016). Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Food chemistry*, 190, 824-831. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.028
- Pai, V., Chanu, T. R., Chakraborty, R., Raju, B., Lobo, R., and Ballal, M. (2011). Evaluation of the antimicrobial activity of *Punica granatum* peel against the enteric pathogens: an in vitro study. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 1, 2, 57-62.
- Peng, Z. Y., Wang, H. Z., Srisawat, N., Wen, X., Rimmelé, T., Bishop, J., et al., (2012). Bactericidal antibiotics temporarily increase inflammation and worsen acute kidney injury in experimental sepsis. *Critical care medicine*. 40, 2, 538. doi: 10.1097/CCM.0b013e31822f0d2e
- Ray, W. A., Murray, K. T., Hall, K., Arbogast, P. G., and Stein, C. M. (2012). Azithromycin and the risk of cardiovascular death. *New England Journal of Medicine*. 366, 20, 1881- 415 1890. doi: 10.1056/NEJMoa1003833
- Ricci, D., Giamperi, L., Bucchini, A., and Fraternali, D. (2006). Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia*. 77, 4, 310-312. doi:10.1016/j.fitote.2006.01.008
- Rios, C. E., Abreu, A. G., Braga Filho, J. A., Nascimento, J. R., Guerra, R. N., Amaral, F. M., & Nascimento, F. R. (2017). *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Frontiers in microbiology*, 8, 148.
- Schulte, W., Bernhagen, J., and Bucala, R. (2013). Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators of inflammation*. 2013, 1-16. doi:10.1155/2013/165974
- Setiadi, R., Sufiawati, I., Zakiawati, D., Nur'aeny, N., Hidayat, W., and Firman, D. R. (2017). Evaluation of antibacterial activity and acute toxicity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed ethanolic extracts in swiss webster mice. *J Dentomaxillofac Sci*. 2, 2, 119-123. doi: 10.15562/jdmfs.v2i2.536
- Sica, A., Erreni, M., Allavena, P., Porta, C. (2015). Macrophage polarization in pathology. *Cellular and molecular life sciences*, 72, 21, 4111-4126. Doi: 10.1007/s00018-015-1995-y
- Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S., Remick, D. G. (2011). The pathogenesis of sepsis. *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, 6, 19-48. Doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130327
- Sun, Y. Q., Xin, T. A. O., Men, X. M., XU, Z. W., Tian, W. A. N. G. (2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *Journal of Integrative Agriculture*, 16, 8, 1808-1818. Doi: 10.1016/S2095-3119(16)61560-5
- Watanabe, N., Suzuki, Y., Inokuchi, S., Inoue, S. (2016). Sepsis induces incomplete M2 phenotype polarization in peritoneal exudate cells in mice. *Journal of intensive care*, 4, 1, 6. Doi: 10.1186/s40560-015-0124-1

442 Yamashiro, S., Kamohara, H., Wang, J. M., Yang, D., Gong, W. H., and Yoshimura, T. (2001).
 443 Phenotypic and functional change of cytokine- activated neutrophils: inflammatory
 444 neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *Journal of*
 445 *Leukocyte Biology*. 69, 5, 698-704. doi: 10.1189/jlb.69.5.698

446 **Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the
 447 absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential
 448 conflict of interest.

449 FIGURES AND TABLES

450 **Table 1. Effect of the hydroalcoholic extract of the *P. granatum* fruit bark on the lung**
 451 **tissue of treated or untreated septic or non-septic animals.** Values are expressed as mean $\pm$
 452 standard deviation. Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA and Student's t-test were used,
 453 adopting $p \leq 0.05$ as significance.

	GROUP	Hemorrhage	Infiltrated	Necrosis	Edema
	SHAM	2 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 1,1	2 $\pm$ 1,1
Lung	CLP	3 $\pm$ 0	2,5 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 1,1
	CLP+HCEPg	2 $\pm$ 0 *	2 $\pm$ 0	1,7 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 0

454 The statistical difference is represented by * between the CLP and CLP + HCEPg groups.

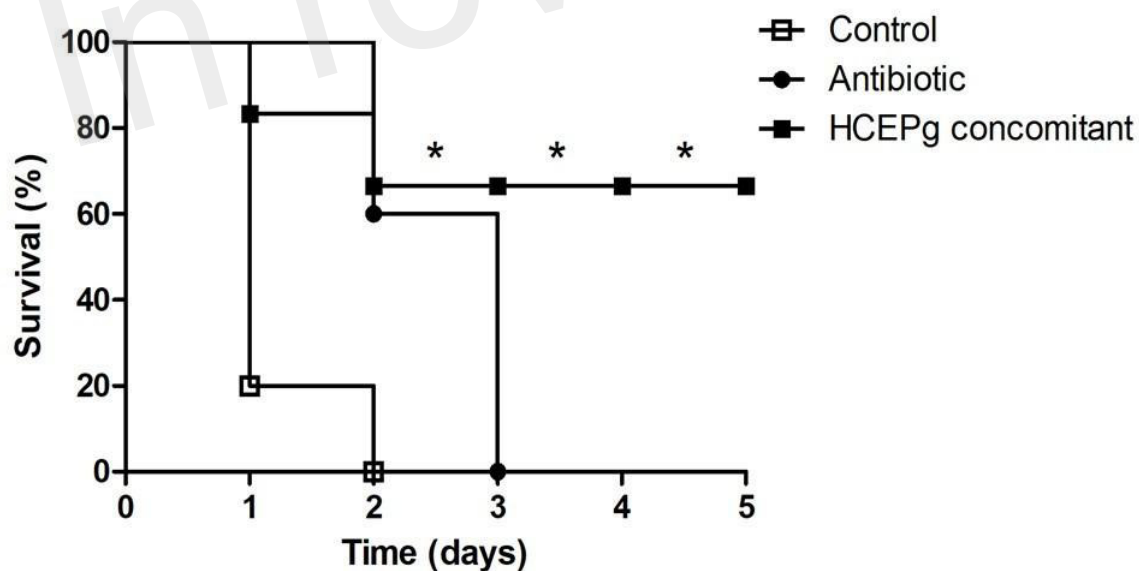


Figure 1. Effect of the hydroalcoholic crude extract of the bark of the fruit of *Punica granatum* (HCEPg) on the survival of septic animals. The animals were divided into 3 groups (n = 5 per group): Control - septic animals (CLP) without treatment, Antibiotic - single dose treated animals after induction of sepsis with broad spectrum antibiotic (Imipenem) following the concentration ratio for the weight of the animals and HCEPg concomitant - single-dose (5mg/kg) treated animals immediately after induction of sepsis. All treatments were performed subcutaneously. Survival was monitored for 5 days and the death rate was recorded every 12 hours. The significant statistical difference is represented by: * between the CLP and HCEPg concomitant groups, adopting $p \leq 0.05$ as significance.

Figure 2.JPEG

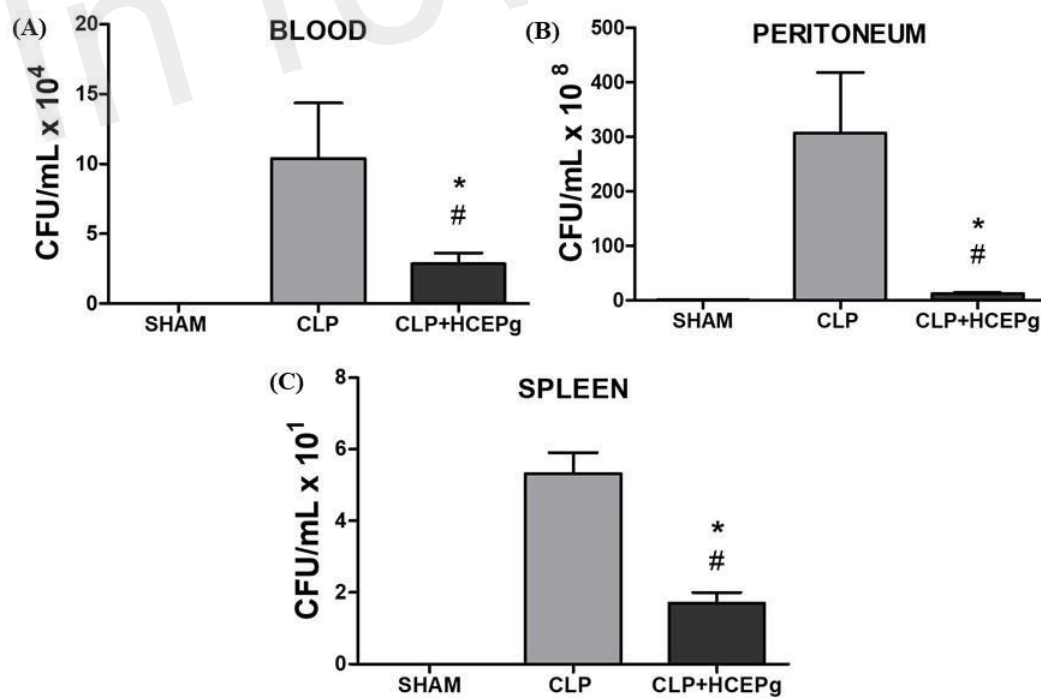


Figure 2. Effect of HCEPg on the growth of colony forming units (CFUs). Graphical representations of the means of colony forming units in peripheral blood (A), peritoneal lavage (B), spleen (C) counts. The statistically significant difference is represented by: * in relation to the CLP group and by # in relation to the sham group. The data represent the mean $\pm$ SD adopting $p \leq 0.05$ as significance.

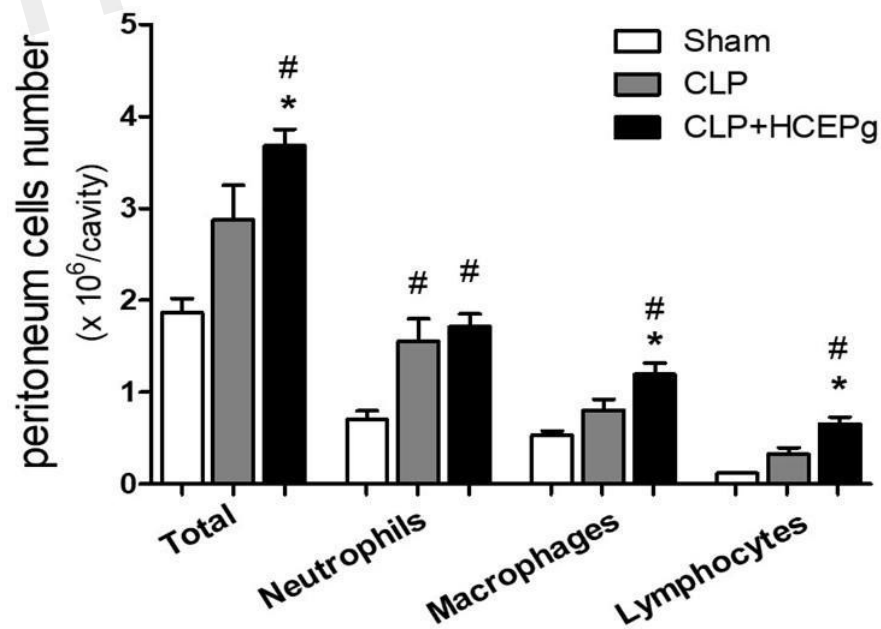


Figure 3. Differential count of peritoneal lavage cells. The animals were divided into 3 groups: SHAM - animals that underwent surgery, but without cecum perforation and without treatment, CLP - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, without treatment and CLP+HCEPg - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, with treatment. The significant statistical difference is represented by: * in relation to the CLP group and # in relation to the Sham group. Data represent the mean $\pm$ SD, n=5 animals per group, adopting $p \leq 0.05$ as significance.

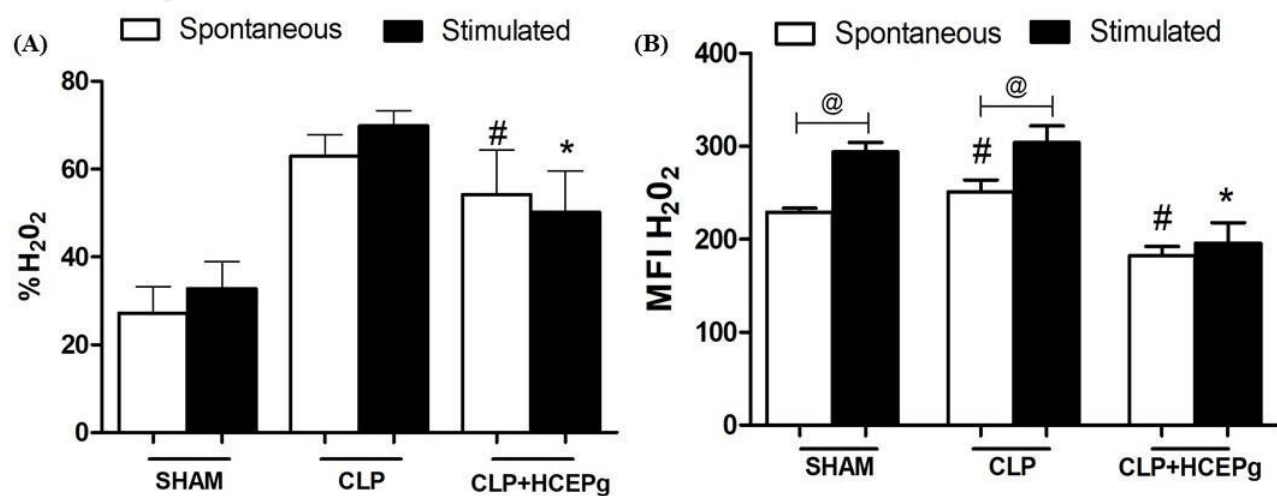


Figure 4. Production of Hydrogen Peroxide in peritoneal cells. The animals were divided into 3 groups: SHAM - animals that received surgery, but without cecum perforation and without treatment, CLP - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, without treatment and CLP + HCEPg - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, with treatment. (A) Percentage of H_2O_2 production by DHR-labeled and PMA-stimulated peritoneal lavage cells. (B) Mean of the Flowering Intensity of cells labeled with DHR and stimulated with PMA. The statistically significant difference is represented by: # in relation to the CLP group stimulated and * in relation to the CLP group spontaneous, @ in relation to the stimulated and spontaneous of same group. The data represent the mean $\pm$ SD of 5 animals per group, adopting $p \leq 0.05$ as significance.

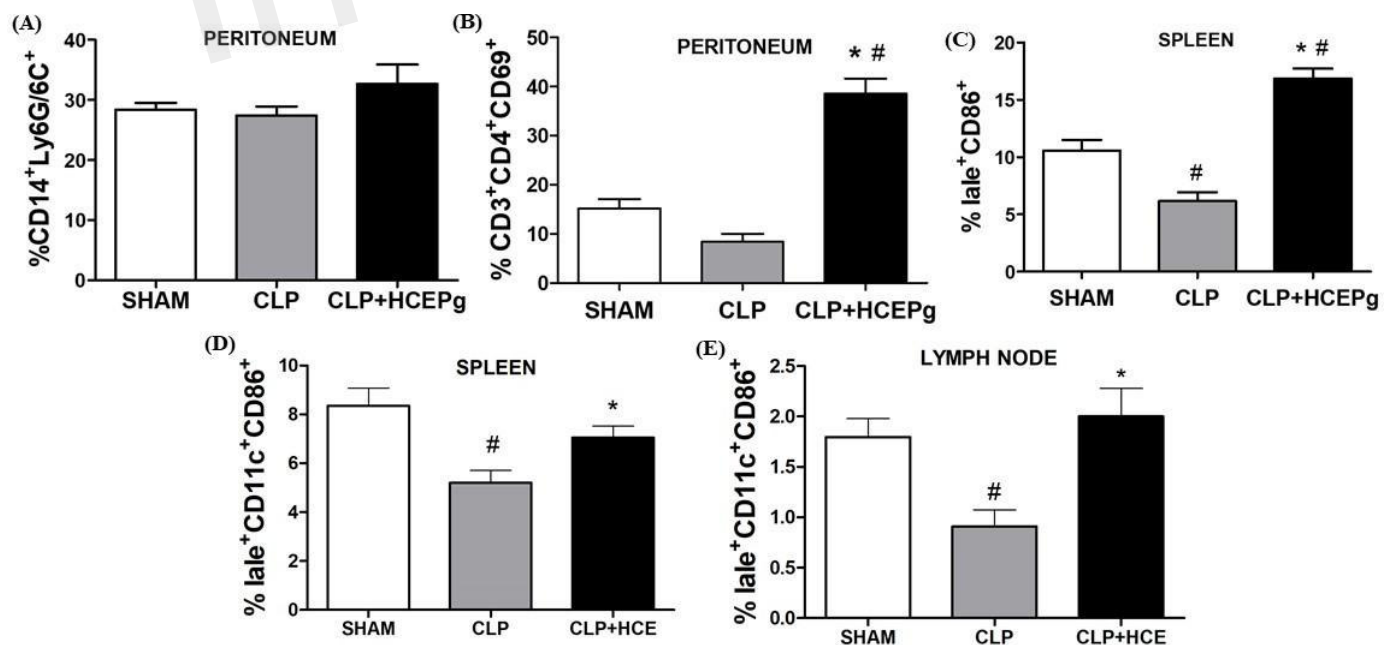


Figure 5. Immunophenotyping of peritoneum, spleen and lymph node cells. The animals were divided into 3 groups: SHAM - animals that underwent surgery, but without cecum perforation and without treatment, CLP - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, without treatment and CLP+HCEPg - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, with treatment. (A) Percentage of CD14⁺Ly6G/6C⁺ macrophages in the peritoneal cavity. (B) Percentage of CD3⁺CD4⁺CD28⁺ lymphocyte T helper subpopulations in the peritoneal cavity. (C) Percentage of cells presenting IaIe+CD86⁺ activated antigens in the spleen. (D) Percentage of activated dendritic cells IaIe+CD11c+CD86⁺ in the spleen. (E) Percentage of activated dendritic cells IaIe+CD11c+CD86⁺ in the lymph node. The statistically significant difference is represented by: * in relation to the CLP group and # in relation to the sham group. The data represent the mean $\pm$ SD adopting $p \leq 0.05$ as significance.

Figure 6.JPEG

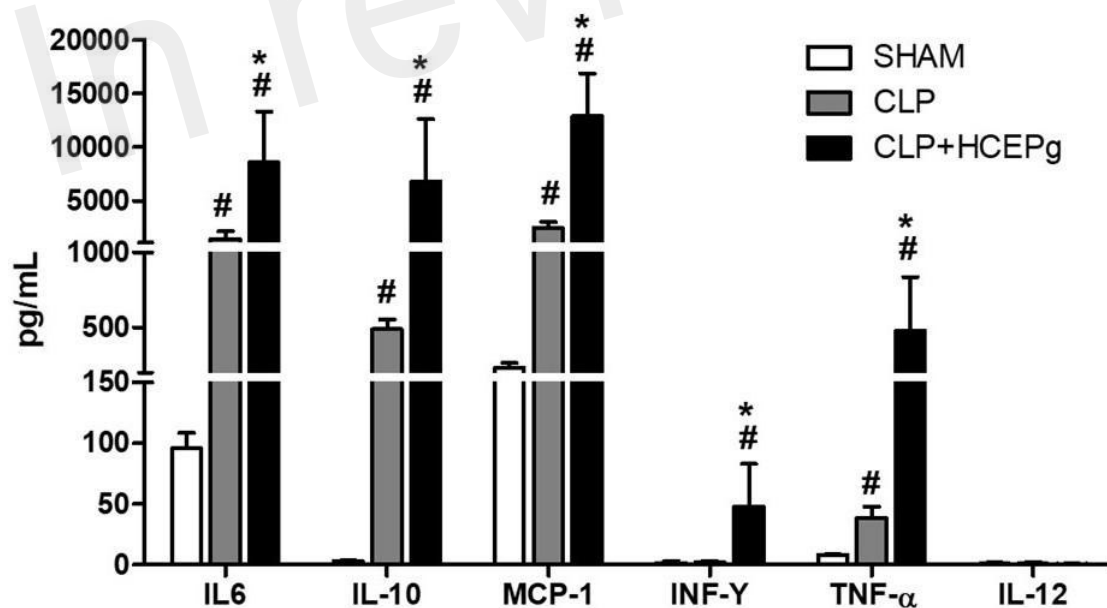


Figure 6. Dosage of serum cytokines from septic animals. The animals were divided into 3 groups: SHAM - animals that underwent surgery, but without cecum perforation and without treatment, CLP - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, without treatment and CLP+HCEPg - animals that had induction of sepsis by ligature and cecal perforation, with treatment. After collection of serum from the animals, cytokines IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α and IL-12 were evaluated. The statistically significant difference is represented by: * in relation to the CLP group and # in relation to the sham group. The data represent the mean $\pm$ SD of 5 animals per group, adopting $p \leq 0.05$ as significance.

10 ANEXO

ANEXO - I

PARECER COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO	
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 01
PROJETO DE PESQUISA	Registro do CEUA: 01/05 Nº do Protocolo: 23115.002346/2015-45 Data de entrada no CEUA: 23/02/2015 Parecer: APROVADO

I – Identificação

Título do projeto:		
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Punica granatum</i> SOBRE O MODELO DE SEPSE LETAL EM CAMUNDONGOS.		
Identificação da equipe executora:		
Profa. Dra. Márcia Cristina Gonçalves Maciel (coordenadora), Prof. Dra. Flávia R. F. Nascimento (colaboradora), Profa. Dra. Rosane N. M. Guerra (colaboradora); Profa. Dra. Ana Paula S. A. Santos (colaboradora); Profa. Dra. Lucilene A. Silva (colaboradora); Prof. Dr. Paulo V. S. Pereira (colaborador); Liana O. Trovão (colaboradora); André A. M. Vale (colaborador).		
Instituição onde será realizado:		
Universidade Federal do Maranhão		
Área temática:	Multicêntrico:	Data de recebimento:
	Não	26/02/2015
Cooperação estrangeira:		Data de devolução
Não		23/03/2015

II – Objetivos:

Avaliar o efeito do extrato de *P. granatum* (EEPg) em modelo de sepse letal por ligadura e perfuração cecal em camundongo.

III – Sumário do projeto:

O projeto apresenta proposta de avaliar, em ensaio pré-clínico, o uso do extrato de romã em modelo de sepsé letal.

Serão utilizados 30 animais, camundongos, Swiss, adultos (8-14 semanas). Os animais serão divididos em 6 grupos: controle (salina); Sham (cirurgia, sem perfuração); CLP (ligadura e perfuração cecal); CLP + antibiótico; CLP + extrato (5 mg/kg); CLP + extrato (50 mg/kg). Após a indução da infecção polimicrobiana, os animais serão tratados segundo descrito acima. Após o tempo de tratamento serão realizadas: avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos; dosagem de citocinas em culturas celulares; contagem de células dos órgãos linfoides; e histopatologia.

IV – Comentário do relator frente à resolução Nº 779 - CONSEPE e complementares em particular sobre:

O projeto é conciso e segue as normas da resolução No 779 – CONSEPE. Os animais estarão sob condições de estresse controladas, mas não propositais. A metodologia de eutanásia está dentro das normas éticas exigidas pelo CONCEA.

V – Pendências

VI – Recomendações:

O projeto é apresentado de forma clara e objetiva, não deixando dúvidas sobre o uso dos animais e as metodologias de análise a serem utilizadas. Desse modo, a única recomendação é a definição do sexo dos animais a serem utilizados, no corpo do projeto.

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

O projeto apresentado é de grande relevância, pois há uma busca constante pelo desenvolvimento de alternativas terapêuticas para infecções. Desse modo, o projeto apresenta a possibilidade real do uso de um produto natural no contexto do tratamento da sepsé. Uma vez que obedece as normas éticas para sua execução consideramos o mesmo **aprovado** pela CEUA.

São Luís, ____20____/____maio____/____2015____

Prof. Dra Lucilene Amorim Silva

Presidente do CEUA / UFMA

ANEXO – II

CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO EM REVISTA CIENTÍFICA

About | Submit | Journals | Research Topics

My Frontiers

Search for articles, people, events and more.

Liana Trovão



Email

Inbox

Outbox

Compose

MESSAGE DETAILS

[« Back to Inbox](#)



From **Frontiers in Immunology Editorial Office**
To **Liana de Oliveira Trovão**
Date Wed, 5 Sep 2018 at 2:49 PM (GMT)
Subject Your manuscript submission - 423366

Dear Dr Trovão,

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Punica granatum L. Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis" to be considered for publication in Frontiers in Immunology, section Microbial Immunology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript.

Kind regards,

Your Frontiers in Immunology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
131 Finsbury Pavement, EC2A 1NT London, United Kingdom
Office T 44 203 5144 082

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org); Frontiers in Immunology is the official journal of the IUIS

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Punica granatum L. Decreases Bacterial Growth and the Systemic Inflammatory Response in Sepsis

Manuscript ID: 423366

Submitted By: MÁRCIA CRISTINA GONÇALVES MACIEL

Authors: Liana de Oliveira Trovão, Patricia Costa Santos Alves, Aluisio da Silva Oliveira, Cesar Alejandro Salazar Cuzcano, Luis Victor Moraes de Moura, André Alvares Marques Vale, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos, Paulo Vítor Soeiro Pereira, Rosane Nassar Meireles Guerra, Flávia Raquel Fernandes Nascimento, Lucilene Amorim Silva, Andresa Aparecida Berretta, MÁRCIA CRISTINA GONÇALVES MACIEL

Journal: Frontiers in Immunology, section Microbial Immunology

Research Topic: The Immunology of Sepsis - Understanding Host Susceptibility, Pathogenesis of Disease, and Avenues for Future Treatment

Article type: Original Research

Submitted on: 05 Sep 2018

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

http://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1241&name=microbial_immunology

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information:

http://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf