

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

JOSÉ BRUNO NUNES FERREIRA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE
***PROPIONIBACTERIUM ACNE* EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE**
LETAL POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP).

RECIFE

2012

JOSÉ BRUNO NUNES FERREIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE
PROPIONIBACTERIUM ACNESE EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE
LETAL POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

RECIFE

2012

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, José Bruno Nunes Ferreira da
Avaliação da atividade imunomoduladora de *Propionibacterium acnes*
em animais submetidos à sepse letal e perfuração do ceco (CLP)/ José
Bruno Nunes Ferreira da Silva– Recife: O Autor, 2013.

89 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia
Industrial, 2013.
Inclui bibliografia

1. Sepse 2. Bactérias 3. Infecção I. Silva, Teresinha Gonçalves
da (orientadora) II. Título

616.944 CDD (22.ed.) UFPE/CCB- 2013- 049

JOSE BRUNO NUNES FERREIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO
PROPIONIBACTERIUM ACNES INATIVADO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À
SEPSE LETAL POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva

UFPE

Prof^a Dr^a Tânia Lúcia Montenegro Stamford

UFPE

Prof^a Dr^a Maria Bernadete de Sousa Maia

UFPE

Recife, 30 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu amor incondicional e por permitir luz, fortaleza, proteção e sabedoria que dão sentido à minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, por abrir as portas do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, oferecendo todo o apoio e infraestrutura para realização deste trabalho. Sou grato por ter convivido com uma excelente profissional, que dedica o seu tempo, pelo ensinamento de cada dia, conforto nas horas difíceis e por acreditar na capacitação do futuro pesquisador em assumir uma postura íntegra e relevante na sociedade.

Aos meus pais José Ferreira Silva Filho e Josefa Nunes Ferreira pela dedicação em me mostrar os objetivos da vida. Sou imensamente grato pelo amor demonstrado dia-a-dia e pela educação e respeito dos quais herdei.

Aos meus irmãos Pedro Henrique e João Paulo e irmãs Rita de Kássia, Suzana Ellen e Silvana Aline pela amizade, companheirismo, solidariedade e vivência.

À Suzete Mendonça pelo suporte e dedicação dispensada, sem a qual este trabalho não teria caminhado.

Ao prof. Dr. Sebastião José de Melo e profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford por terem aceitado o convite de fazer parte da banca do meu exame de qualificação.

À Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia por ter prontamente aceito fazer parte da banca de avaliação deste trabalho e pelas sugestões apontadas para o aprimoramento desta dissertação.

Ao colega Eryvelton de Souza Franco pelo apoio técnico na implementação do modelo experimental.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial pelo incentivo ao saber e dedicação.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial pelo apoio e ajuda prestada.

Aos colegas Carlson Júnior e Ingrid Campos no apoio e exemplo na elaboração e realização dos experimentos.

Aos alunos Samara Kelly e Thiago Coutinho pela preciosa ajuda e empenho prestados para a realização deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica pela ajuda e apoio fornecido.

Aos colegas do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos pela receptividade, companheirismo, troca de conhecimentos, sugestões, qualidade e compromisso com a pesquisa.

Aos colegas do Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial pelo convívio e aprendizado.

A CAPES, pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

“Que ensinamentos transmitiríamos ao mundo se soubéssemos

que se tratava da nossa última oportunidade?

Se deixássemos de existir amanhã,

o que desejaríamos deixar como herança?”

(trecho do livro "*A Lição Final*", de Randy Pausch)

RESUMO

Sepse é uma resposta inflamatória sistêmica que apresenta falha na resposta imune do hospedeiro associado à infecção. *Propionibacterium acnes* é uma bactéria conhecida por sua atividade imunomoduladora *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo, foi avaliado o efeito da *P. acnes* inativada por fenol, na formulação comercial *Imunoparvum*[®], sobre a infecção polimicrobiana induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Camundongos albinos suíços machos (*Mus musculus*) foram divididos em 5 grupos (n=8-16/grupo). A administração de salina 0,9% (grupo controle S-CLP) ou *Imunoparvum*[®] (grupo tratado) foi realizada 1, 3, 5 e 7 dias antes da CLP. A CLP foi realizada no oitavo dia. A taxa de sobrevivência foi analisada com oito animais de cada grupo. Para determinação do número de células peritoneais, citocinas, contagem bacteriana e MPO, os animais foram sacrificados 6 h após a indução de sepse e tiveram a cavidade peritoneal lavada com PBS + EDTA. O grupo tratado com *Imunoparvum*[®] mostrou aumento da taxa de sobrevivência de 50% em 96 horas. O tratamento com *Imunoparvum*[®] causou um aumento na migração celular para o peritônio, induziu uma significativa redução no lavado peritoneal da citocinas pró-inflamatórias TNF- α , MCP-1 e a citocina anti-inflamatória IL-10 (TNF- α de $112,89 \pm 7,31$ pg/mL para $61,04 \pm 18,93$ pg/mL, MCP-1 de $1321,98 \pm 3,84$ pg/mL para $778,89 \pm 1,24$ pg/mL e IL-10 de $1837,41 \pm 173,87$ pg/mL para $718,80 \pm 47,52$ pg/mL). Por outro lado, houve um aumento nas concentrações de IL-6 (de $340,33 \pm 11,48$ pg/mL para $416,89 \pm 8,14$ pg/mL) no grupo tratado em relação ao controle. Não houve diferença nos níveis de mieloperoxidase (MPO) no pulmão dos animais do grupos *Imunoparvum*[®] e controle. O tratamento com *Imunoparvum*[®] reduziu o número de bactérias viáveis na cavidade peritoneal. De acordo com os resultados, *Imunoparvum*[®] promoveu o aumento da taxa de sobrevivência de animais com sepse, em parte atribuída às suas propriedades imunomoduladoras, importantes no combate de microorganismos patogênicos, bem como ao melhor controle da infecção através da redução da contagem bacteriana.

Palavras-chaves: *Propionibacterium acnes*, Sepse, Imunomodulação

ABSTRACT

Sepsis is a systemic inflammatory response associated with a failure in the immune system host response following bacterial infection. The immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes* has been shown *in vivo* and *in vitro*. The propose of this study was to determinate the efficiency of *Imunoparvum*[®], a commercial formulation of *P. acnes* inactivated by phenol, on polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP), a animal model. Mice *Mus musculus* were divided into 5 groups. The animals received i.m. administrations per day during 7 days on day 1, 3, 5 and 7 of saline 0.9% (control group – S-CLP) or *Imunoparvum*[®]. CLP was performed on the 8th day. Eight animals from each group were left to assess the survival rate. The cell counts, cytokines levels, MPO levels and antibacterial activity was performed 6 hafter induction of sepsis and the peritoneal cavity was washed with PBS+EDTA. The *Imunoparvum*[®] group showed increase of survival rate and increased the leukocytes migration and peritoneal neutrophil migration. *Imunoparvum*[®] treatment decreased TNF- α , MCP-1 and IL-10 levels in the peritoneal cavity (TNF- α , from 112.89 ± 7.31 pg/mL to 61.04 ± 18.93 pg/mL, MCP-1, from 1321.98 ± 3.84 pg/mL to 778.89 ± 1.24 pg/mL and IL-10, from 1837.41 ± 173.87 pg/mL to 718.80 ± 47.52 pg/mL). Furthermore, the IL-6 levels were increased (from 340.33 ± 11.48 pg/mL to $416,89 \pm 8,14$ pg/mL). The MPO levels between control and *Imunoparvum*[®] were similar and not significant. The treatment also reduced bacterial numbers in the abdominal cavity. In agreement with the results, *Imunoparvum*[®] increased survival rate of septic animals, as well showed immunomodulation, important in the combat against pathogenic microorganisms.

Palavras-chaves: *Propionibacterium acnes*, Sepsis, Immunomodulation therapy

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Geral	5
2.2 Específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Sepses	7
3.1.1 Conceitos gerais: histórico e definições	7
3.1.2 Epidemiologia na sepses	8
3.1.3 Fisiopatologia e mediadores envolvidos na sepses	10
3.1.4 Modelos Animais de Sepses	12
3.1.5 Imunomodulação na sepses	13
3.2 <i>Propionibacterium acnes</i>	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Material biológico	20
4.2 Composição da suspensão contendo <i>Propionibacterium acnes</i> inativado	20
4.3 Animais	20
4.4 Indução da sepses por ligadura e perfuração cecal	20
4.5 Avaliação da sobrevivência dos animais submetidos à CLP e tratados com <i>P. acnes</i> inativado	21
4.6 Obtenção das células peritoneais	22

4.7 Cultura de bactérias e enumeração de unidades formadoras de colônia (UFC).	22
4.8 Determinação de MPO no pulmão	22
4.9 Análise de citocinas	23
4.10 Análise estatística	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Análise da sobrevida	25
5.2 Avaliação da migração celular peritoneal induzida após tratamento com <i>Imunoparvum</i> [®]	28
5.3 Avaliação das citocinas no lavado peritoneal	30
5.3.1 TNF- α	30
5.3.2 Interleucina – 6 (IL-6)	32
5.3.3 Interleucina – 10 (IL-10)	33
5.3.4 MCP-1	35
5.4 Determinação de MPO	36
5.5 Avaliação do <i>clearance</i> bacteriano	38
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS	42
ANEXO A –Trabalho completo publicado no 2º EBIT/2011	61
ANEXO B – Artigo: <i>Propionibacterium acnes</i> inactivated attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis by modulating inflammatory factors.	62

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1. Efeito do pré-tratamento por via intramuscular com <i>Imunoparvum</i>[®] na sobrevida de animais submetidos à S-CLP	25
Figura 2. Efeito da associação profilática e curativa por via intramuscular com <i>Imunoparvum</i>[®] na sobrevida de animais submetidos à S-CLP	26
Figura 3. Efeito do tratamento por via intramuscular com <i>Imunoparvum</i>[®] na sobrevida de animais logo após a indução de sepse por CLP.	27
Figura 4. Efeito do tratamento com <i>Imunoparvum</i>[®] (n=7) sobre o número de leucócitos no lavado peritoneal.	28
Figura 5. Efeito do tratamento com <i>Imunoparvum</i>[®] (n=8) sobre o número de neutrófilos no lavado peritoneal.	29
Figura 6. Efeito do pré-tratamento com <i>Imunoparvum</i>[®] em animais (n=8) na expressão de TNF-α no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal.	30
Figura 7. Efeito do pré-tratamento com <i>Imunoparvum</i>[®] em animais (n=8) na expressão de IL-6 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal.	32
Figura 8. Efeito do pré-tratamento com <i>Imunoparvum</i>[®] em animais (n=8) na expressão de IL-10 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal.	34
Figura 9. Efeito do pré-tratamento com <i>Imunoparvum</i>[®] em animais (n=6) na expressão de MCP-1 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal.	35
Figura 10. Dosagem de Mieloperoxidase (MPO) no pulmão de animais tratados com <i>Imunoparvum</i>[®] (n=6) e submetidos à sepse letal.	36
Figura 11. Número de bactérias no lavado peritoneal de animais submetidos à CLP e pré-tratados com <i>Imunoparvum</i>[®].	38

LISTA DE ABREVIATURA

BASES – Estudo Brasileiro de Epidemiologia da Sepsis

CDC – “Center for Disease Control – Centro de Controle e Prevenção de Doenças”

CLP – Ligadura e perfuração cecal

CSO – Clara solidificada de ovo de galinha

DA – dermatite atópica

EDTA- Etilenodiaminotetracético

ELISA - “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

IFN- γ , - Interferon gama

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP – 1 - Proteína-1 Quimiotática dos Monócitos

NFk-B Fator de transcrição nuclear Kappa B

OVA – ovalbumina

PaCO₂ - Pressão arterial de dióxido de carbono

PAMPs – Padrões moleculares associados ao patógeno

PBS- Tampão fosfato-salino

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

TLR – receptores *Toll like*

TNBS – ácido sulfônico trinitrobenzênico

UFC – Unidade Formadora de Colônia

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome clínica complexa, denominada síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) que resulta numa resposta prejudicial ou nociva do hospedeiro à infecção causada por bactérias, fungos, vírus e parasitas (BENJAMIM et al., 2001; COHEN, 2002). Nas últimas décadas a sepse tem recebido atenção por ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva, com opções terapêuticas limitadas (HUTTUNEN, AITTONIEMI et al., 2011; CHALUPKA, TALMOR, 2012).

Agentes terapêuticos como anti-lipídios, antagonista do receptor IL-1, inibidor do fator de ativação plaquetária, anticorpo monoclonal para Fator de Necrose Tumoral (anti-TNF- α), imunoglobulinas, ibuprofeno, altas doses de corticosteróides, antiendotoxinas e muitos outros não obtiveram sucesso nas triagens clínicas e falharam. Apesar dos avanços tecnológicos e terapêuticos dos últimos anos, pouco progresso foi conseguido em relação à mudança de mortalidade na sepse (OPAL, CROSS, 1999; CARVALHO, TROTTA, 2003; NGUYEN, SMITH, 2007).

O reconhecimento precoce da sepse com uma intervenção inicial agressiva contra distúrbios hemodinâmicos e o manejo racional dos antimicrobianos são estratégias certamente benéficas. Avanços nessas estratégias terapêuticas aumentarão as chances prognósticas, porém não se espera que sejam de grande magnitude. A combinação de terapias imunomoduladoras parece ser o futuro da pesquisa nessa área (CARVALHO, TROTTA, 2003).

Os estudos epidemiológicos da sepse e de suas variáveis tem auxiliado no direcionamento das terapias e no acompanhamento dos pacientes acometidos por esta patologia. Porém, no Brasil esses estudos são escassos, o que dificulta o direcionamento nas tomadas de decisões para diminuir a mortalidade (SALES et al., 2006). As poucas análises do Brasil corroboram com as variáveis dos outros países por acometer, em sua maior parte, idosos e pessoas do sexo masculino (MARTIN et al., 2003).

A sepse ocorre frequentemente em pacientes idosos e o seu ônus econômico é grande e crescente. O envelhecimento populacional no ocidente continuará a agravar este fardo. Os custos de tratamento de pacientes sépticos contribuem para as despesas nacionais de saúde. Os elevados custos no atendimento nas Unidades de Terapia

Intensiva (UTI) implicam na limitação de oportunidades de redução de custos para pacientes sépticos. Nesta situação, a prevenção da sepse é a chave para a contenção de custos (CHALUPKA, TALMOR, 2012).

A necessidade de conter a evolução da infecção em pacientes acometidos por sepse tem estimulado os centros de pesquisa na descoberta de alvos terapêuticos direcionados ao sistema imunológico para uma resposta efetiva e segura do hospedeiro. Os imunomoduladores são importantes na ativação de populações celulares e na estimulação ou supressão de mediadores imunológicos como as citocinas. Essas substâncias são capazes de potencializar ou diminuir a resposta do sistema imunológico. O uso da imunoterapia tem sido considerado uma alternativa para contenção, prevenção e cura de diversas enfermidades (OPAL, 2010).

Entre uma variedade de imunomoduladores, a bactéria *Propionibacterium acnes* tem sido estudada e utilizada na terapia de diversas doenças, como antivirais, anticâncer, antiparasitário e antibacteriano, validando o seu efeito modulador (PERRY, LAMBERT, 2006). Tendo em vista, o seu potente efeito adjuvante na imunoterapia este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma formulação composta por *P. acnes* inativado sobre à sepse letal induzida por ligaduração e punção do ceco (CLP).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o efeito do *Imunoparvum*[®] na sepse polimicrobiana induzida por ligadura e punção do ceco (CLP).

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito do *P. acnes* inativado na sepse grave após tratamento profilático, terapêutico ou uma combinação de ambos via ensaio de sobrevivência em animais submetidos à CLP.
- Quantificar a migração celular para a cavidade peritoneal nos animais tratados com *P. acnes* inativado.
- Determinar as concentrações das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1 em animais submetidos à sepse por CLP e tratados com *P. acnes* inativado.
- Quantificar a enzima mieloperoxidase (MPO) no pulmão de animais com sepse severa tratados com *P. acnes* inativado.
- Determinar o número de bactérias no lavado peritoneal dos animais dos grupos pré-tratado com *P. acnes* inativado e controle.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sepses

3.1.1 Conceitos gerais: histórico e definições

Sepses é um termo derivado do verbo grego “*sepein*”, que significa putrefazer ou apodrecer e há mais de 2700 anos foi utilizada nos poemas de Homero (CATENACCI, KING, 2008; CHANG, LYNN, GLASS, 2010).

Pierre Adolphe Piorry (1794-1879), um médico francês, introduziu o termo médico septicemia (intoxicação pútrida sanguínea) e piemia (pús no sangue) sem estabelecer as diferenças e os mecanismos patogênicos envolvidos (FERRAZ, 2008). Em seguida, Semmelweis, no século XIX, foi o primeiro pesquisador que desenvolveu uma visão moderna da sepses. Lister, Halstead e Vong Bergmann, contemporâneos de Semmelweis, também desenvolveram técnicas de antisepsia que resultaram em uma grande redução na incidência da mortalidade causada por infecções (MOUTA Jr, 2007).

A partir da definição de Schottmuller em 1914 que estabelece pela primeira vez a relação direta entre a invasão de microrganismos do foco da infecção para a corrente sanguínea e a presença de sinais e sintomas, muitos termos foram aplicados para definir a sepses (SCHOTTMUELLER, 1914).

As investigações clínicas e experimentais, ao longo do século XX, levaram a uma melhor distinção entre os componentes da fisiopatologia da sepses. Em 1991, a *Society of Critical Care Medicine* e *American College of Chest Physicians* foram convocados a fim de padronizar as terminologias relacionadas à fisiopatologia, gravidade dos quadros inflamatórios secundários à infecção e a terapêutica da sepses (BONE et al., 1992a; BONE et al., 1992b).

A sepses foi então definida como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) associada à infecção que deve apresentar duas ou mais das seguintes condições: a) hipertemia (temperatura maior que 38°C) ou hipotermia (temperatura menor que 36°C); b) taquicardia (frequência cardíaca maior que 90 batimentos por min); c)

taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações por min ou PaCO₂ menor que 32 mmHg); d) contagem dos leucócitos totais no sangue maior que 12.000/mm³ ou mais de 10% de formas imaturas (bastões) (BONE et al., 1992a; BONE et al., 1992b). A associação desta resposta à disfunção múltipla de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão é denominada sepse grave (MARTIN et al., 2003). No choque séptico existe hipotensão persistente mesmo após reanimação volêmica adequada (MARIK, LIPMAN, 2007).

3.1.2 Epidemiologia da sepse

Os estudos epidemiológicos da sepse tem sido importantes para notificar o real impacto desta patologia nos sistemas de saúde em todo o mundo, tanto do ponto de vista social como econômico. É uma síndrome que apresenta altas taxas de mortalidade e representa elevados custos em UTI (CARVALHO, TROTTA, 2003; CHALUPKA, TALMOR, 2012).

Nos Estados Unidos, segundo o *Center for Disease Control* (CDC), em 1990 havia cerca de 450.000 casos de sepse por ano com mais de 100.000 mortes (CDC, 1990). Um estudo epidemiológico conduzido por Angus et al., (2001) acrescentou informações importantes sobre a epidemiologia da sepse naquele país. Neste estudo havia 3 casos de sepse grave por 1000 habitantes, e 2,26 casos por 100 altas hospitalares. Dos cerca de 751.000 casos de sepse grave no estudo, quase 70% (513.000) receberam cuidados intensivos. A taxa de mortalidade estimada foi de 28,5%, ou um total de 215.000 mortes a nível nacional, e o custo médio por caso foi \$22.100, com um custo total anual de \$16,7 bilhões. Em 2002, o CDC publicou um relatório, considerando a sepse como a 10^a causa de morte, sendo responsável por 1,3% das mortes naquele ano (ANDERSON, 2002; JAIMES, 2005).

Nos países europeus os estudos epidemiológicos relatados apresentam ampla variação de taxas de incidência e de mortalidade, refletindo diferentes tomadas de decisões nas coletas de resultados, bem como diferenças nos procedimentos de coleta de dados ou abordagens metodológicas. Um estudo multicêntrico francês apresentou uma alta incidência de choque séptico com 8,2 casos por 100 internações associado a uma taxa de mortalidade de 60,1% (ANNANE et al., 2003). Recentemente, um estudo aprovado pela Sociedade Européia de Cuidados Intensivos, envolvendo diversas

instituições em 24 países revelou uma mortalidade variando entre 14% e 41% em unidades hospitalares e 8% a 35% em UTI. Neste relatório, existe a demonstração e correlação da falência múltipla de órgãos e mortalidade em pacientes críticos com sepse (VINCENT et al., 2006).

Na América Latina, Jaimes (2005) revisou 20 estudos epidemiológicos publicados entre 1994 e 2000 sobre septicemia, sepse e sepse grave da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Cuba, Equador e México, alertando que as abordagens clínicas e epidemiológicas têm sido por vezes inadequadas em termos de projetos de pesquisa, população de estudo e resultado clínico. Como resultado, salientou que é pouco provável que na América Latina haja uma menor incidência de sepse ou um melhor prognóstico em relação aos países desenvolvidos.

No Brasil, o estudo BASES – Estudo Brasileiro de Epidemiologia da Sepse, entre 2001 e 2002, realizado em cinco UTI das regiões sul e sudeste, encontrou taxas de mortalidade de 11%, 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente, em pacientes com SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico (SILVA et al., 2004). Sales et al., (2006) analisou dados de 75 UTI em regiões diferentes e encontrou taxas de mortalidade de 16,7% para sepse, 34% para sepse grave e 65,3% para choque séptico.

Koury et al. (2006) publicaram um estudo caracterizando pacientes com sepse admitidos em UTI em um hospital privado de grande porte na cidade do Recife e observaram que as taxas de mortalidade nos casos de sepse grave e choque séptico foram 36,3%, 63,8%, respectivamente semelhantes àquelas encontradas por Silva et al., (2004). Zanon et al., (2008) avaliaram a mortalidade de pacientes sépticos tratados nas UTI de Passo Fundo que apresentaram as seguintes taxas: 10,1%, 22% e 64,8% para sepse, sepse grave ou choque séptico. A mortalidade no Brasil tem tido relevância por ser superior à encontrada em outros países (HENKIN et al, 2009).

De acordo com as informações apresentadas acima, está claro que a sepse é uma condição comum tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos. O aumento da incidência e a mortalidade tem aumentado substancialmente ao longo das últimas duas décadas. O envelhecimento populacional, procedimentos mais invasivos, o uso de fármacos imunossupressores e a AIDS são fatores que promovem uma maior incidência, e espera-se que esta tendência se acelere no futuro (ANGUS et al., 2001; SALES et al., 2006).

3.1.3 Fisiopatologia e mediadores envolvidos na sepse

A sepse é iniciada quando microrganismos agridem as barreiras naturais de defesa do corpo, tais como a pele e mucosas. Se a resposta imune for incapaz de deter a infecção local, o microrganismo ou suas toxinas podem invadir a corrente sanguínea. Uma vez na circulação, produtos microbianos provocam uma resposta inflamatória que leva a ativação da liberação de vários mediadores, com efeitos pró- e anti-inflamatórios. A associação das toxinas liberadas com o aumento da ativação desses mediadores e das vias celular e humoral pode levar a falência de órgãos e morte (QUEZADO, BANKS, NATANSON, 1995; HOTCHKISS, KARL, 2003; RIEDEMANN, GUO, WARD, 2003).

Uma variedade de elementos necessários na patogênese da sepse e vias metabólicas e imunológicas tem sido identificados nesses últimos anos. As intensas investigações pré-clínicas e clínicas associaram o desenvolvimento do processo séptico à resposta imune, superantígenos, toxinas bacterianas e alterações da coagulação. Já foram identificados mais de 100 potenciais indicadores como marcadores de prognóstico na sepse (HOTCHKISS, KARL, 2003; OPA, ESMON, 2003; MARSHALL, REINHART, 2009).

Quando os agentes patogênicos invadem o hospedeiro, as proteínas transmembrana de reconhecimento dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), também denominadas de receptores *Toll like* (TLRs) iniciam a resposta imunológica (KONO, ROCK 2008). O TLR-2 é responsável pelo reconhecimento dos peptídeos glicanos das bactérias gram-positivas, os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram-negativas são reconhecidos pelo TLR-4 (RUSSEL, 2006; OSAWA, WILLIAMS, SINGH, 2011). A invasão dos microrganismos patogênicos estimula a produção de citocinas, mediadores inflamatórios secretados por componentes dos sistemas imune da resposta inata e adaptativa, que atuam coordenando uma ampla variedade de reações inflamatórias ao nível tecidual e desempenham um papel proeminente na patogênese da sepse (VAN DER POLL, 2001). A presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação e ativação das células circulantes pode facilitar a

evolução de uma infecção local para um quadro sistêmico. Estes fatores são responsáveis pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas em modelos experimentais e quadros clínicos de sepse (BENJAMIM, 2001).

As citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), que são precocemente produzidas no processo séptico, e interleucina-6 (IL-6) promovem uma série de eventos genéticos, bioquímicos e clínicos. Estas citocinas atuam sobre a liberação de mediadores secundários responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória (BONE, 1991; THIJIS, HACK, 1995).

Baixas concentrações de TNF- α são primordiais para a defesa do hospedeiro por limitarem a propagação de microrganismos patogênicos para a corrente sanguínea, desencadeando a adesão neutrofílica no endotélio, ativação de cininas e do sistema complemento. Porém, com a sua hiper-estimulação o quadro inflamatório evolui e a lesão tecidual torna-se potencialmente letal. O TNF- α assume uma atividade deletéria ao organismo, desregulando o sistema imune, promovendo a ativação de várias outras citocinas, bem como do sistema oxidativo celular (AZEVEDO, 2007; CIANCIARULLO et al., 2008; FRACASSO, 2008). Na sepse as ações de citocinas pró-inflamatórias podem ser inibidas, também, por inibidores de receptores solúveis de IL-1 (IL-1R tipo II) e receptores de TNF- α . Esses mediadores são encontrados tanto nos soros como exsudatos obtidos de pacientes com sepse ou em modelos experimentais, e parecem tanto contrabalançar as ações dos mediadores pró-inflamatórios, através da redução da síntese e da liberação desses mediadores, quanto antagonizar seus efeitos (DINARELLO, 1997; BENJAMIM, 2001).

O organismo responde ainda a agente infecciosos liberando citocinas anti-inflamatórias. Esses mediadores são encontrados tanto no soro quanto exsudato de pacientes com sepse ou em modelos experimentais. A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória importante na fisiopatologia da sepse, que tenta contrabalançar as ações dos mediadores pró-inflamatórios, através da redução da síntese e da liberação desses mediadores, quanto antagonizar seus efeitos. Por outro lado, a produção e liberação excessiva de mediadores anti-inflamatórios são prejudiciais à resposta do organismo contra o agente invasor, pois inibe a liberação dos mediadores

fundamentais para o recrutamento e ativação das células da resposta inflamatória e imunes (DINARELLO, 1997; BENJAMIM, 2001; VAN DE POLL, 2001).

Na sepse, os neutrófilos estão envolvidos na diminuição da invasão do patógeno.. No entanto, há a falência da migração de neutrófilos para o foco inflamatório, que é extremamente importante para o agravamento do quadro instaurado, onde é observada a disseminação bacteriana, contribuindo para a evolução clínica do paciente e impedindo a eliminação do foco primário de infecção (BENJAMIM et al., 2000; BENJAMIM et al., 2002; ALVES-FILHO et al., 2005; ALVES-FILHO et al., 2008; REDDY, STANDIFORD, 2010).

3.1.4 Modelos Animais de Sepses

Existe uma dificuldade nos modelos animais de sepse de representar completamente a complexidade clínica da sepse humana. Nos humanos, a sepse se desenvolve ao longo de horas a dias, muitas vezes a evolução é prolongada e resulta na falha múltipla de órgãos. Em contrapartida, nos modelos animais o percurso é curto e agudo, variando significativamente em sua complexidade e relevância clínica, levantando a questão do potencial fisiopatológico em diferentes circunstâncias (ZANOTTI-CAVAZZONI, GOLDFARB, 2009).

O modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) é o modelo experimental para indução da sepse mais empregado nas pesquisas científicas, além de se assemelhar com a progressão e características da sepse humana, tem contribuído para o conhecimento do envolvimento de componentes da imunidade nesta síndrome, incluindo a identificação de novos potenciais alvos terapêuticos (DEJAGER et al., 2011). Os modelos de indução de sepse por LPS e CLP apresentam o mesmo nível de mortalidade, mas são significativamente diferentes quanto à cinética e produção de citocinas. A imunoterapia na sepse é baseada na produção de citocinas e, o modelo de LPS não reproduz o perfil desses mediadores. CLP é considerado o padrão-ouro para estudos experimentais da sepse (REMICK et al., 2000).

Os modelos animais de sepse, tanto por injeção intravenosa de bactérias, por exemplo, *Staphylococcus aureus* (CROSSARA-ALBERTO et al., 2002) ou produtos bacterianos (TAVARES-MURTA et al., 2001) quanto por CLP correspondem à sepse

grave (BENJAMIM et al., 2000) demonstram claramente a falha na migração neutrofílica.

3.1.5 Imunomodulação na sepse

O entendimento da fisiopatologia de diversas doenças e a correlação com os novos conhecimentos da imunofarmacologia tem estimulado a terapia moderna com o uso de imunomoduladores. A biotecnologia tem disponibilizado novos produtos terapêuticos naturais, sintéticos e recombinantes no mercado, o que representa novas possibilidades para os pacientes com infecções recorrentes ou crônicas baseadas na resposta insuficiente do sistema imune. Os imunomoduladores podem ser utilizados para caracterizar os eventos dentro de uma variedade de processos biológicos ou de forma mais importante para a clínica, apresentando forte potencial de utilidade (LABRO, 2000; LIMA, 2007).

A imunomodulação consiste em dois processos: imunoestimulação através de substâncias que potencializam a resposta imune, enquanto a imunossupressão é a supressão da imunidade, diminuindo a atividade imunológica. A consequência da ação dos imunomoduladores é o aumento ou não da resposta inata ou adaptativa. Essas substâncias podem ser usadas na prevenção, bem como no tratamento de pacientes. No entanto, uma pré-condição para o uso racional de imunomoduladores é a realização de exames da situação do sistema imunológico dos pacientes antes do início do tratamento (KIRKLEY, 1999).

Na sepse, alguns pacientes necessitam de terapias que possam suprimir a resposta imune, enquanto outros se beneficiam da ativação da resposta imune (HUTTUNEN; AITTONIEMI, 2011). A idéia de imunointervenção na sepse tem evoluído ao longo das últimas décadas e baseia-se na sua fisiopatologia, que leva a estimulação de vias de sinalização intracelular, levando à ativação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias, entre as quais: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α (HOTCHKISS, KARL, 2003; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2008).

As terapias experimentais na sepse são desenvolvidas, mas poucas são utilizadas em triagens clínicas para humanos (O'CALLANG, REDMOND, 2006). Apesar

daintensa pesquisano campo a aplicação de uma variedade de terapias direcionadas à modulação da resposta imune do hospedeiro, a mortalidade dos pacientes sépticos ainda está presente, pois o uso de fármacos não tem obtido sucesso nas aplicações clínicas (GIAMARELLOS-BOURBOULIS, 2008).

3.2 *Propionibacterium acnes*

O *Propionibacterium acnes* é um bacilo Gram-positivo, pleomórfico, imóvel, presente na microflora cutânea humana, tendo como habitat natural o folículo sebáceo. Foi previamente classificado como *Corynebacterium parvum* por apresentar semelhança morfológica e organizacional, com base na análise da parede celular, testes sorológicos e testes de fermentação (CUMMINS, JOHNSON, 1974; FUNKE et al., 1997; WEBSTER, 1990; PERRY, LAMBERT, 2006).

A linhagem original do microrganismo foi isolada de um material clínico por Mayer (1926), denominando-o de *Corynebacterium parvum infectiosum*. No entanto, seguiu-se a nomenclatura utilizada por Prévot (1940), *Corynebacterium parvum*. Condições de anaerobiose são requeridas para um crescimento mais eficaz desta espécie, embora algumas cepas sejam aerotolerantes (WEBSTER, 1990; FUNKE et al., 1997).

É devido aos efeitos imunomoduladores que o *P. acnes* tem sido aplicado como ferramenta de estudo da resposta imune celular em modelos experimentais, mostrando-se um potente adjuvante (PERRY, LAMBERT, 2006). Segundo alguns autores, o fator ativador da atividade imunestimulante está localizado na parede celular do microrganismo (PRÉVOT et al., 1968; KOUZNETZOVA et al., 1974).

Inicialmente foi demonstrado que a injeção da suspensão inativada estimula o sistema retículo-endotelial e causa uma diminuição de carbono coloidal em camundongos tratados por via endovenosa com a bactéria (HALPERN et al., 1963). Howard et al., em 1973, propuseram que o efeito primário na administração de *C. parvum* é a atividade fagocítica, na qual macrófagos atuam sobre a produção de anticorpos, por capturar, degradar e apresentar a porção imunogênica do antígeno de uma forma mais eficiente (WATSON, SLJIVIC, 1976). Além disso, o aumento de níveis de anticorpos para o microrganismo foi observado em animais tratados

(WOODRUFF, McBRIDE, DUNBAR, 1974). Em testes *in vitro*, o *P. acnes* apresentou influência quimiotática sobre neutrófilos (LEE et al., 1982).

Longhini (2002) isolou um polissacarídeo solúvel da parede de *P. acnes* por extração fenólica e relatou aumento do número de macrófagos no exsudato peritoneal além de atividade fagocítica em animais tratados via intraperitoneal.

Farber e Glasgow (1972) em seus estudos observaram que a administração de *C. parvum* viável ou inativado interferiram na produção de interferon, deprimindo-o quando animais eram expostos aos vírus da doença de Newcastle (VDN) e Chikungunya (CV) ou elevando sua concentração sorológica em animais com quadro endotêmico desafiados com *Escherichia coli*. Outro estudo relatou o efeito *in vitro* na capacidade de macrófagos e linfócitos peritoneais produzirem interferon quando expostos ao *C. parvum* em resposta aos VND e CV, causando um efeito inibitório nesta proteína (FISCHBACH, GLASGOW, 1975).

Weiss e Cox (1990) administraram profilaticamente e de forma terapêutica doses altas ou moderadas de *P. acnes* e interferons isolados ou associados contra a infecção experimental do vírus da peritonite infecciosa felina (PIF) e observaram que as aplicações não reduziram significativamente a mortalidade dos gatos tratados e não-tratados. No entanto, o tempo de sobrevivência dos gatos tratados com IFN isoladamente ou associado ao *P. acnes* foi muito maior do que dos gatos não-tratados, mesmo todos os grupos tendo recebido doses letais da cepa virulenta do vírus PIF.

A administração de *P. acnes* e outros imunomoduladores como BCG antes do desafio com diferentes tipos virais, proporcionaram resistência do hospederio contra infecções causadas por *Herpesvirus hominis* tipo 2, vírus da encefalomiocardite e citomegalovírus (GLASGOW et al., 1977).

Aplicações semanais de *P. acnes* regrediram o Papiloma oral em cães de idades diferentes (MEGID et al., 2001). Nos estudos de Hall et al., (1994) houve regressão completa do papiloma bovino em 15 semanas, quando aplicado intra lesões. O *P. acnes* foi utilizado com sucesso na terapia de endometrites, osteomielite em eqüinos e no tratamento de feridas (VAN KAMPEN, 1997). O tratamento de doenças pulmonares em cavalos com injeções de *P. acnes* apresentou resposta imunoestimulatória e imunomoduladora caracterizadas por um aumento da expressão de CD4, concentração

de linfócitos no sangue e no fluido da lavagem broncoalveolar, aumento da atividade não fagocítica dos leucócitos e decréscimo celular no pulmão (FLAMINIO, RUSH, SHUMAN, 1998). Davis, Rush, Blecha em 2003, utilizaram *P. acnes* na profilaxia das inflamações pulmonares crônicas em eqüinos e relataram um aumento de interferon gama (IFN γ), células natural killers (NK) e células mononucleares da circulação periférica. Resultados como estes sugerem que a ação imunomoduladora do *P. acnes* se dá pelo aumento da produção de IL-1, IFN e células NK.

A capacidade do *P. acnes* inativado promover a resposta celular Th1 tem sido relatada em modelo murino (MATSUI et al., 1997; Mac Donald et al., 2001). Nos estudos de Cervi et al., (2004) e MacDonald et al., (2002) a bactéria foi utilizada para induzir este tipo de resposta. Entretanto, dependendo do protocolo de tratamento com *P. acnes*, a resposta a um antígeno tipicamente Th2 pode ser suprimida ou potencializada. Braga et al (2003) utilizando um modelo murino de hipersensibilidade imediata em que camundongos sensibilizados no tecido subcutâneo com clara solidificada de ovo de galinha (CSO), e desafiados 14 dias após, com ovoalbumina (OVA) na pata, desenvolveram uma reação eosinofílica Th2. No entanto, o grupo de animais pré-tratados com *P. acnes* inativado por fenol, apresentaram reação de hipersensibilidade tardia (Th1) quando a última injeção ocorreu uma semana antes do implante com CSO. Quando a última injeção foi administrada no dia do implante, houve potencialização da resposta Th2, com intenso infiltrado eosinofílico no local do desafio com OVA. Resultados como estes sugerem que *P. acnes* pode modular células apresentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas (CDs), pois sabe-se que essas células estão intimamente associadas à indução da resposta celular dos tipos Th1 ou Th2.

A ação potencial de *P. acnes* sobre CDs tem sido sugerida pelo aumento do número de células imaturas *in vivo* encontradas no sangue periférico e fígado de animais tratados, e em estudos *in vitro* com a maturação dessas populações celulares da medula óssea de camundongos (MacDONALD et al., 2002; YONEYAMA et al., 2001; ZHANG et al., 2004). SQUAIELLA et al., (2006), administraram por via subcutânea um componente polissacarídico solúvel purificado de *P. acnes*, relataram a maturação de CDs e apresentação de antígenos para linfócitos T de maneira mais eficazes e em maior porcentagem.

Mais recentemente, Kitagawa et al., (2011) investigaram a imunoterapia da dermatite atópica (DA), utilizando baixas doses de *P. acnes* em ratos. O tratamento através da vacinação melhorou e impediu as manifestações clínicas da DA, com aumento da expressão cutânea e sistêmica de citocinas do tipo Th1, sem suprimir citocinas do tipo Th2.

Além de atuar como adjuvante para anticorpos no sistema fagocitário mononuclear e aumentar a resistência a infecções, o *P. acnes* estimula a produção de citocinas como IFN- γ , IL-1 α , IL-6 e TNF- α , IL-18 e IL-12 (SMITH, 1993; MATSUI et al., 1997; OKAMURA et al., 1995; TSUJI et al., 1999).

O tratamento de neoplasias com *P. acnes* tem sido relatado na literatura. A inibição do crescimento tumoral (HALPERN et al., 1966; WOODRUFF, McBRIDE, DUNBAR, 1974; KENNEDY, SUTTON, CONLEY, 1989) e a atividade tumoricida *in vitro* de macrófagos incubados com *P. acnes* sobre células cancerígenas (KELLER, KEIST, JOLLER, 1994) são alguns dos efeitos demonstrados nesses estudos.

O *P. acnes* também foi aplicado em ensaios clínicos para ação tumoricida, verificando a diminuição do tumor e aumento da sobrevida de pacientes que utilizaram a suspensão associada à quimioterapia (SALOMAA et al., 1985; FISHER et al., 1990; LIPTON et al., 1991).

O aumento da resistência de animais tratados com *P. acnes* quando desafiados com diferentes patógenos como, *Plasmodium berghei*, *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Leishmania major*, *Schistosoma mansoni*, *Klebsiella pneumoniae*, pode estar relacionado com a sua imunomodulação. O clearance bacteriano, a diminuição da parasitemia e aumento da sobrevida foram observados nesses estudos (NUSSENZWEIG, 1967; BRENER, CARDOSO, 1976; HA et al., 1986; HILL, 1987; ABATH et al., 1988; TEIXEIRA et al., 1996; SQUAIELLA et al., 2001).

As pesquisas sobre os efeitos da *P. acnes* na modulação de diversas respostas imunológicas possibilitaram o desenvolvimento de uma formulação contendo a bactéria inativada por fenol pronta para administração por via intramuscular, produzida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e distribuído pelo Laboratório do Estado de Pernambuco – LAFEPE.

É encontrado comercialmente como *Imunoparvum*[®], sendo utilizado no tratamento de pacientes que apresentam imunossupressão, existindo ainda outras suspensões de *P. acnes* inativado comerciais como EqStim[®] e Parvulam[®], também utilizadas na imunoterapia ativa inespecífica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico

Para este estudo foi utilizada uma suspensão de *P. acnes* inativada produzida pelo Departamento de Antibióticos e comercializada como *Imunoparvum*[®].

4.2. Composição da suspensão contendo *Propionibacterium acnes* inativado

A suspensão tem um volume final de 2 mL, contendo 2mg/mL de *P. acnes* (*C. parvum*), mais 0,5% de ácido fênico e uma solução salina a 0,85%.

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos (com cerca de 60 dias de nascidos) albinos swiss (*Mus musculus*) provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais realizados seguiram os princípios técnicos e éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Pernambuco – UFPE, número 23076.039440/2011-30.

4.4 Indução da sepse por ligadura e perfuração cecal

A sepse letal foi induzida usando o modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP) conforme descrito por Baker et al., (1983). Os animais foram anestesiados via intra-peritoneal com uma solução de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg). Em seguida foi feita a laparotomia. O ceco foi mobilizado, ligado abaixo da válvula ileocecal e perfurado 1 vez com agulha de calibre 18G para indução da sepse severa. O ceco foi colocado novamente na cavidade peritoneal e o abdome foi suturado. Ao final do procedimento foi administrado 1 mL de solução salina estéril, via

subcutânea, como fluido de ressuscitação, com finalidade de prevenir a hipotensão pós-operatória (RITTIRSCH ET AL., 2009).

4.5 Avaliação da sobrevida dos animais submetidos à CLP e tratados com *P. acnes* inativado

Os animais foram tratados em dias alternados em 7 dias com a suspensão de *P. acnes* inativado por fenol na dose de 40µg/animal.

Os camundongos foram divididos em 05 grupos. Metade dos animais de cada grupo foi submetida à sepse letal por CLP para análise da sobrevida e a outra metade para análise dos itens 4.5, 4.6 e 4.8.

Grupo 1 – *Sham* (n=16): os camundongos foram submetidos à laparotomia, porém o ceco não foi perfurado (falsa cirurgia).

Grupo 2 - controle (S-CLP) (n=16): os camundongos receberam injeção de solução salina estéril (0,9%), nos dias 1, 3, 5 e 7 e no 8º dia foi realizada a indução de sepse por CLP.

Grupo 3 - tratamento profilático com *P. acnes* inativado (n=16): Os animais foram pré-tratados uma vez ao dia durante sete dias, nos dias 1, 3, 5 e 7 por via intramuscular (i.m.) com *Imunoparvum*[®], e no oitavo dia houve a da sepse letal.

Grupo 4 - tratamento curativo com *P. acnes* inativado(n=8): Os animais foram tratados com *Imunoparvum*[®] por via i.m., logo após a indução da sepse por CLP em dias alternados.

Grupo 5 - associação de tratamento profilático e terapêutico com *P. acnes* inativado(n=8): os animais foram tratados por via i.m. antes e após a indução da sepse

A mortalidade dos animais foi acompanhada a cada 12h até o quarto dia após a indução da sepse. Nos experimentos subsequentes dos itens 4.5, 4.6 e 4.7. o tratamento com *Imunoparvum*[®] foi feito 7 dias antes da CLP, nos dias 1, 3, 5 e 7, no 8º dia houve indução de sepse severa e os animais foram sacrificados 6h após indução de sepse por CLP.

4.6 Obtenção das células peritoneais

Os camundongos foram sacrificados 6h após a indução de sepse por CLP e as células peritoneais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 3 mL de PBS contendo 1mM de EDTA. O número total de células presentes no exsudato recuperado da cavidade peritoneal foi determinado em aparelho ABX Micros 60. A contagem diferencial para determinação da proporção de neutrófilos no exsudato foi feita em preparações de lâminas em citocentrífuga e coradas com panótico. A contagem diferencial de células foi feita em microscópio óptico em lente cujo aumento foi de 40x.

4.7 Cultura de bactérias e enumeração de unidades formadoras de colônia (UFC).

Seis horas após a indução da sepse, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo da técnica citada no item 4.5. O grau de infecção foi determinado através da contagem do número de UFCs presentes no lavado peritoneal dos animais submetidos ao CLP. O lavado peritoneal foi então diluído (1:100; 1:1000; 1:10000) em PBS estéril e 10 µL dessa solução semeada em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. Após o semeio, as placas foram incubadas por 18h a 32°C e contado o número de colônias. Os resultados foram expressos como Log de UFC/mL no lavado peritoneal.

4.8 Determinação MPO no pulmão

Amostras do tecido pulmonar foram coletadas em solução tampão (fosfato monobásico e dibásico) acrescentadas de HTAB (hexadecil trimetil brometo de amônio) e trituradas com auxílio do polytron 1X. Completou-se o volume da solução para uma concentração de 50mg/mL. Centrifugou-se durante 5 min a 6.000 rpm. Adicionou-se 200µL de solução de meio tampão (0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H₂O₂) em cada poço. Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação

enzimática foi interrompida com a adição de 30 μ L de azida sódica (1%) em cada poço. As soluções foram lidas em placas de ELISA a 540nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos.

4.9 Análise de citocinas

Após a quantificação dos leucócitos, o lavado peritoneal foi centrifugado durante 10 minutos a 2.000 rpm e o sobrenadante armazenado em temperatura de -40°C para determinação das citocinas. As concentrações das citocinas TNF- α (sensibilidade 8 pg/mL e curva padrão 8-1000 pg/mL), IL-6 (sensibilidade 4 pg/mL e curva padrão 4-500 pg/mL) e IL-10 (sensibilidade 30 pg/mL e curva padrão 30-4000 pg/mL) foram determinadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience).

4.10 Análise estatística

A sobrevida dos animais foi expressa como porcentagem de animais sobreviventes analisadas pelo teste Mantel-Cox logrank (X^2 , chi-squared), e as diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$. Os demais dados experimentais foram avaliados comparando-se a média dos valores encontrados, por análise de variância (one-way ANOVA) seguida de pós-teste (test t) para análise da atividade antibacteriana e teste de Bonferroni para os demais experimentos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (D.P) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $P < 0,05$, como determinado utilizando o software GraphPad (versão 5.0)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da sobrevivida

No tratamento profilático com *Imunoparvum*[®] a sobrevivida dos animais foi de 100% nas primeiras 24 h, enquanto o grupo controle obteve uma sobrevivência de apenas 12,5%. Com 36 h de observação os dados mostraram uma taxa de sobrevivida de 0% dos animais do grupo controle. Neste mesmo período, os animais do grupo pré-tratado com *Imunoparvum*[®] apresentaram uma taxa de sobrevivida de 62,5%. Após as 96 h de observação, o grupo pré-tratado apresentou uma sobrevivida de 50%. Estes dados sugerem um papel profilático de *Imunoparvum*[®] na sepse letal induzida por CLP (Figura 1).

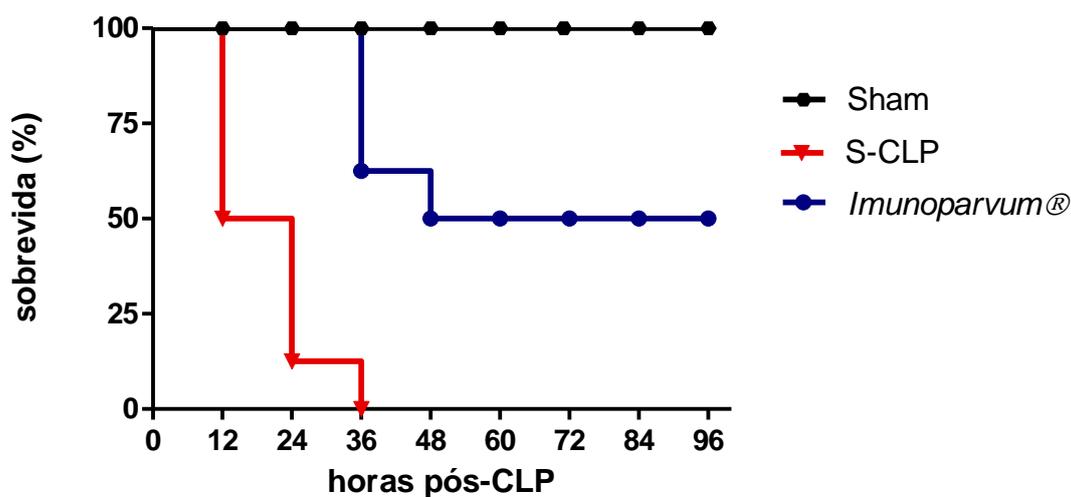


Figura 1. Efeito do pré-tratamento por via intramuscular com *Imunoparvum*[®] na sobrevivida de animais submetidos à S-CLP. A taxa de sobrevivida foi observada a cada 12 horas durante 96 horas expressa em porcentagem dos animais ($n=8$). Os grupos são estatisticamente diferentes com $P \leq 0,0001$ pelo teste de Mantel-Cox. * $p \leq 0,05$ em relação ao Controle pelo teste Mantel-Cox logrank (X^2 , chi-squared).

Em seguida foi avaliado se a associação do efeito profilático do *Imunoparvum*[®] a um pós-tratamento aumentaria a sobrevivida dos animais submetidos a sepse letal. O

grupo tratado com *Imunoparvum*[®] apresentou uma taxa de sobrevida de 75% nas primeiras 24 h após a cirurgia enquanto o grupo controle apresentou percentual de sobrevida de apenas 12,5%. Após 36 horas de análise, os animais do grupo tratado apresentaram um índice de sobrevivência de 50%. No entanto, durante as 96 h analisadas a sobrevida final foi de 25% (Figura 2).

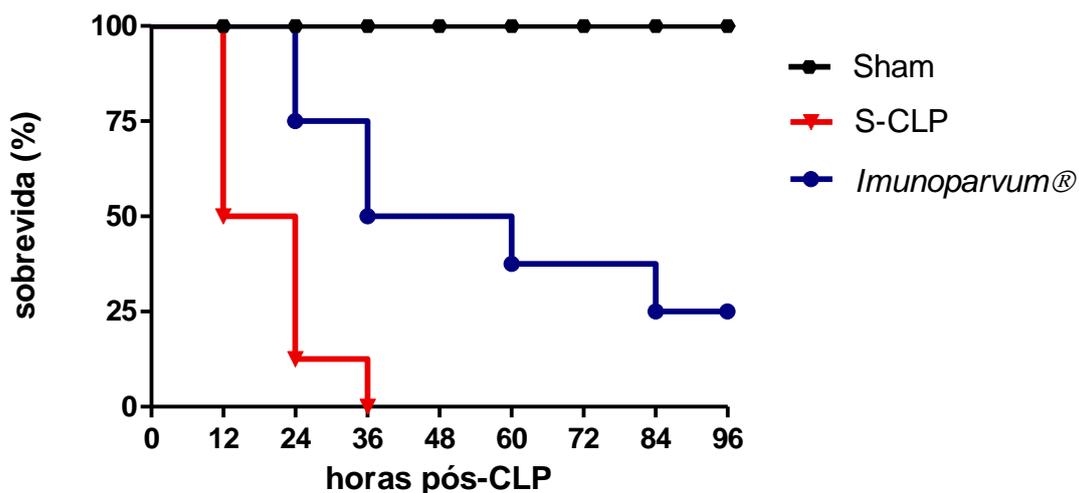


Figura 2. Efeito da associação profilática e curativa por via intramuscular com *Imunoparvum*[®] na sobrevida de animais submetidos à S-CLP. A taxa de sobrevida foi observada a cada 12 horas durante 96 horas e expressa em porcentagem ($n=8$). Os grupos são estatisticamente diferentes com $P \leq 0,0001$ pelo teste de Mantel-Cox. * $p \leq 0,05$ em relação ao Controle pelo teste Mantel-Cox logrank (X^2 , chi-squared).

Por fim, avaliou-se a participação na sobrevida de camundongos com o tratamento do *Imunoparvum*[®] após a indução da sepse por CLP (Figura 3). Neste experimento, em 24 h após a cirurgia os grupos controle e pós-tratado apresentaram taxa de sobrevida de 12,5%. Percentual que se manteve durante as 96 h apenas para o grupo tratado com *Imunoparvum*[®].

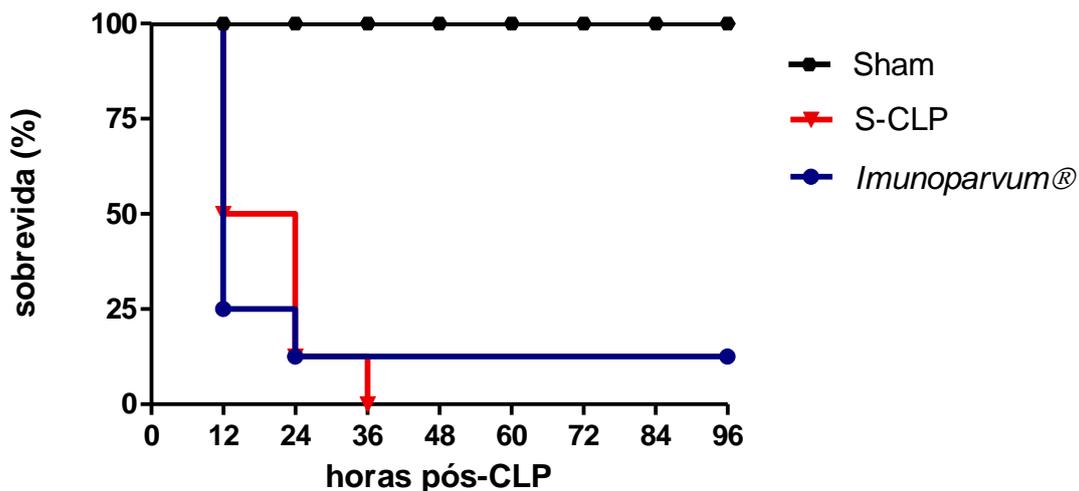


Figura 3. Efeito do tratamento por via intramuscular com *Imunoparvum*[®] na sobrevivência de animais logo após a indução de sepse por CLP. A taxa de sobrevivência foi observada a cada 12 horas durante 96 horas expressa em porcentagem dos animais ($n=8$). Os grupos são estatisticamente diferentes com $P \leq 0,0001$ pelo teste de Mantel-Cox. * $p \leq 0,05$ em relação ao Controle pelo teste Mantel-Cox logrank (X^2 , chi-squared).

Os animais do grupo *Sham* tiveram 100% de sobrevivência em 96 horas avaliadas, isso comprova que a manipulação cirúrgica foi realizada em condições assépticas. As taxas de sobrevivência de grupos controles na sepse severa é de 0% em 72h (RITTIRSCH et al., 2009), o que está de acordo com o nosso controle.

Camundongos pré-tratados com *Imunoparvum*[®] mostraram aumento da sobrevivência e menor concentração do vírus da raiva diante de animais submetidos apenas ao agente infeccioso (MEGID, KANENO, 2000). A sensibilização de animais com *P. acnes* e desafiados com *Listeria monocytogenes* aumentou a taxa de sobrevivência em 100% quando comparado ao grupo desafiado apenas com o patógeno (MOCHIZUKI et al., 2005). Alvarez et al., reportaram o papel protetor de *Propionibacterium acidipropionici* em ratos desafiados com *Salmonella Typhimurium*. O agente protetor inibiu a colonização pelo patógeno e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais (ALVAREZ et al., 1996).

Collins & Scott em 1974 relataram a proteção exercida de *P. acnes* na resistência à *Salmonella enteritidis* e aumento da sobrevivência de animais desafiados com este micro-organismo patogênico. Por outro lado, a administração da enterobactéria

seguida da administração de *P. acnes* não foi eficaz contra o efeito letal da infecção, potencializando a patologia instalada e conferindo diminuição na sobrevivência. Estes achados corroboram com os nossos resultados em que o pré-tratamento induz aumento na sobrevivência dos animais com sepse e a administração após a cirurgia não protege os animais da inflamação sistêmica.

Além da análise da sobrevivência dos animais tratados com *Imunoparvum*[®], outros parâmetros foram analisados, como migração celular, contagem bacteriana no lavado peritoneal e concentração de citocinas para o grupo tratado profilaticamente, cuja sobrevivência mostrou-se mais eficaz com uma proteção significativamente maior em relação aos demais grupos.

5.2 Avaliação da migração celular peritoneal induzida após tratamento com *Imunoparvum*[®]

Para avaliar a capacidade de migração de células responsáveis pela resposta inflamatória foi realizada a contagem de leucócitos totais. O tratamento com *Imunoparvum*[®] aumentou a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (figura 4).

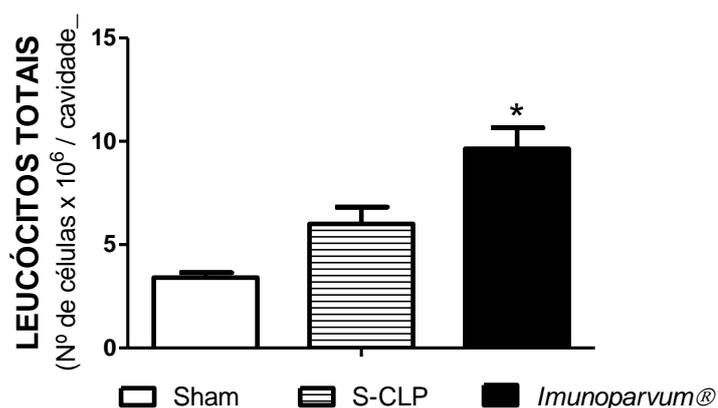


Figura 4. Efeito do tratamento com *P. acnes* (n=7) sobre o número de leucócitos no lavado peritoneal. Os resultados foram expressos com média \pm S.E.M * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle e *Sham* (n=6) pelo teste de Bonferroni.

O recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso foi marcante nos animais do grupo *Imunoparvum*[®] (figura 5).

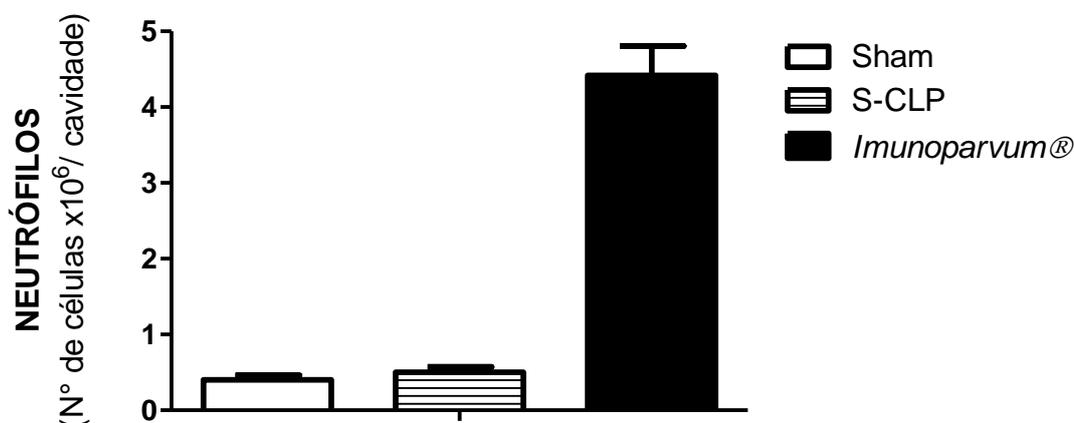


Figura 5. Efeito do tratamento com *P. acnes* (n=8) sobre o número de neutrófilos no lavado peritoneal. Os resultados foram expressos com média \pm S.E.M. * $p \leq 0,05$ em relação aos grupo controle (n=6) e *Sham* (n=6) pelo teste de Bonferroni.

Os neutrófilos desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro. Eles são as primeiras células que migram para o local da infecção e são capazes de destruir os microrganismos, produzindo agentes bactericidas, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROs). Animais submetidos à ligadura e perfuração do ceco apresentam falha no rolamento, adesão e transmigração de neutrófilos para o local da infecção. Este impedimento está associado à permanência da infecção, aumento da disseminação do número de bactérias do exsudato e sangue, causando uma maior mortalidade nos animais (BENJAMIM et al., 2002; ALVES-FILHO et al., 2005). Posto isto, a sobrevivência na sepse depende de um rápido recrutamento de neutrófilos para o local primário da infecção bem como atividade microbicida destes fagócitos.

(FETEROWSKI et al., 2001). Neste estudo, *P. acnes* causou um aumento significativo na migração de polimorfonucleares, especialmente de neutrófilos para o foco infeccioso, melhorando a capacidade de resposta do hospedeiro a infecção e consequentemente aumentando a sobrevivência dos animais.

5.3 Avaliação das citocinas no lavado peritoneal

5.3.1 TNF- α

Com o objetivo de avaliar a ação da *P. acnes* inativada na liberação de citocinas inflamatórias, neste experimento analisou-se a concentração de TNF- α no exsudato peritoneal. No nosso estudo, foi observada uma diminuição significativa na concentração de TNF- α no lavado peritoneal dos animais tratados com *P. acnes* inativado (Figura 6). O efeito do *Imunoparvum*[®] no nível de TNF- α após a CLP reduziu em 50% a sua concentração quando comparado ao grupo controle.

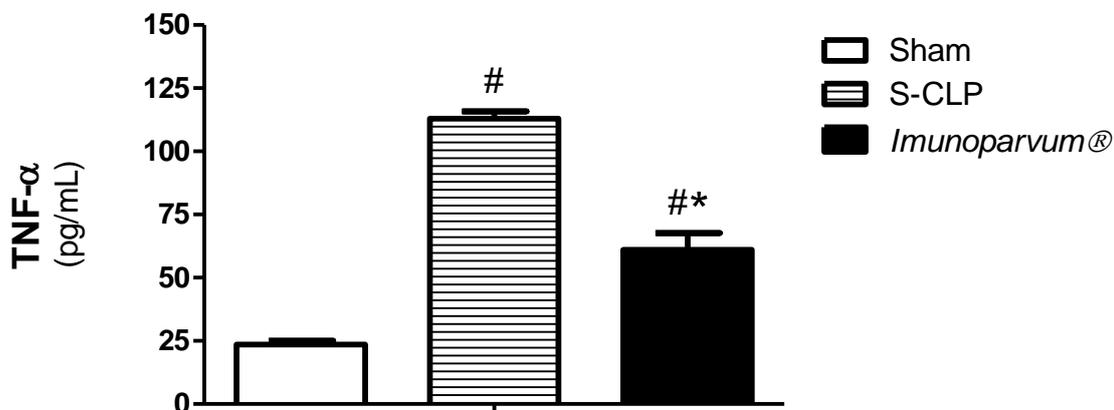


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com *Imunoparvum*[®] em animais (n=8) na expressão de TNF- α no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de TNF- α na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais. Resultados expressos como média \pm S.E.M #p \leq 0,05 quando comparados com o grupo *Sham* (n=6). * P \leq 0,05 quando comparado com o grupo controle (n=6) pelo teste de Bonferroni.

A expressão de mediadores pró-inflamatórios é uma resposta do hospedeiro ao processo infeccioso. As citocinas são importantes no início da resposta inflamatória

sistêmica, apresentando considerável atuação na patogênese e na falha múltipla de órgãos na sepse. Na sepse experimental e em humanos, o TNF- α é a primeira citocina que aparece na circulação (VAN DER POLL, 1993; LIAUDET et al., 2001; ANNANE, BELLISSANT, CAVAILLON, 2005).

Scheingraber et al., (2001) e Grigoryev (2008) relataram o aumento de TNF- α na cavidade abdominal, e piora do quadro em pacientes sépticos. Níveis de TNF- α podem ser detectados no plasma de muitos pacientes e estão relacionados à febre, anormalidade hemodinâmicas, leucopenia, aumento de enzimas hepáticas, coagulopatias e à disfunção de órgãos (GARDLUND et al., 1995). Recentemente estudos reportaram que anticorpos anti-TNF- α reduziram a mortalidade e atenuaram a severidade da disfunção de órgãos em pacientes sépticos (PANACEK et al., 2004; RICE et al., 2006).

A imunoterapia da sepse focada no bloqueio de TNF- α é promissora em modelos animais. A diminuição da concentração de TNF- α no exsudato peritoneal em animais sépticos foi vista nos estudos de REDDY et al., (2009), que inibiram a aldose-redutase, um importante mediador no estresse oxidativo. Pang et al., (2010) avaliaram o efeito modulador do cloreto de metileno em animais com sepse e relataram a diminuição de TNF- α no lavado peritoneal com consequente aumento da sobrevivência.

Alves-Filho et al., (2010) também observaram a diminuição de TNF- α no soro de animais tratados com interleucina 33 (IL-33) submetidos à sepse letal por CLP. Entretanto, para o lavado peritoneal não houve diferença entre os grupos teste e controle. Outros estudos associaram o aumento da sobrevivência à redução dos níveis de TNF- α no soro de animais com sepse (MA et al., 2006; MACIEL et al., 2008; AZEVEDO et al., 2010; RUTHES et al., 2012). A diminuição da concentração de TNF- α no soro e exsudato peritoneal de animais tratados com mirra, um óleo essencial obtido de espécies do gênero *Commiphora* aumentou a sobrevivência na sepse severa (KIM et al., 2012).

Longhini (2002) observou níveis elevados de TNF- α na cultura de células do exsudato peritoneal obtidas de camundongos tratados com um polissacarídeo solúvel purificado obtido da bactéria *P. acnes*. Por outro lado, nossos resultados mostraram uma diminuição desta citocina no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal, sendo um dos fatores relacionados ao aumento da sobrevivência. Provavelmente, outros componentes bacterianos contribuíram para os resultados encontrados no nosso estudo,

difereindo dos resultados encontrados por Longhini que usou apenas um polissacarídeo solúvel.

5.3.2 Interleucina – 6 (IL-6)

A quantificação de IL-6 dos grupos S-CLP, tratado com *P. acnes* inativado e *Sham* é mostrada na figura 6. Os resultados da presente da análise mostram que 6 h após a indução da sepse, os animais pré-tratados apresentaram aumento da concentração de IL-6 em relação ao grupo controle ($416,89 \pm 8,14$ pg/mL, $340,33 \pm 11,48$ pg/mL), respectivamente.

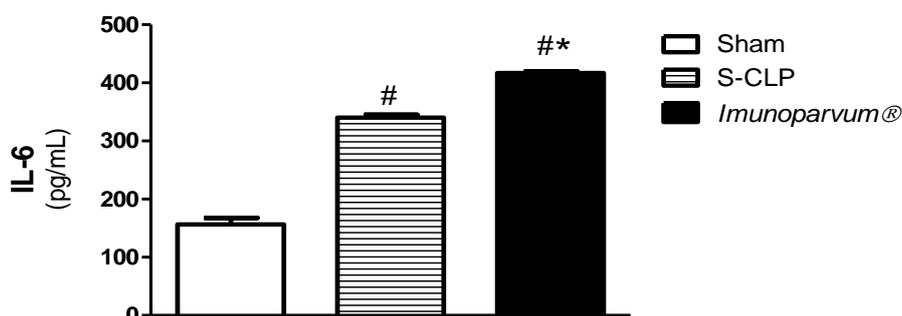


Figura 7. Efeito do pré-tratamento com *Imunoparvum*® em animais (n=8) na expressão de IL-6 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de IL-6 na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais. Resultados expressos como média \pm S.E.M #p \leq 0,05 quando comparados com o grupo *Sham* (n=6). * P \leq 0,05 quando comparado com o grupo controle (n=6) pelo teste de Bonferroni.

O mediador IL-6 tem sido descrito como um agente de efeitos pró-e anti-inflamatórios. Uma de suas características é a capacidade de induzir a produção de proteínas de fase aguda no fígado. Além do TNF- α , altas titulações de IL-6 estão relacionadas diretamente com a mortalidade durante o choque endotóxico. Alguns estudos experimentais em animais e cultura celular têm demonstrado essa correlação (MOZES et al., 1991; DAMAS et al., 1992; CASEY et al., 1993; PATEL et al., 1994).

IL-6 pode afetar diretamente as funções de adesão e migração de neutrófilos, promovendo a atividade e a produção de importantes moduladores de neutrófilos (EJIMA et al., 2003; UNDERHILL, 2003).

Altas doses de anti-IL-6 ou baixas doses deste anticorpo não aumentaram a sobrevivência de animais submetidos à sepse por CLP. Isso sugere que, níveis excessivos de IL-6 são prejudiciais e que o seu bloqueio não contribuiu na sobrevivência desses animais, talvez porque os baixos níveis de IL-6 sejam benéficos para a defesa do hospedeiro (RIEDEMANN, GUO, WARD, 2003).

Camundongos deficientes para IL-6 não apresentaram melhoria de sobrevivência em sepse por CLP. Além disso, há relatos de que animais deste tipo sofrem de deficiência imunológica e respostas de fase aguda (KOPF et al., 1994; LEON, WHITE, KLUGER, 1998). No nosso estudo houve um aumento de 20,81% nas concentrações de IL-6, entretanto este aumento não foi tão pronunciado a ponto de interferir na sobrevivência dos animais. Como os estudos da literatura são conflitantes a respeito do papel exato da IL-6 na sepse, acreditamos que a presença de uma concentração equilibrada de IL-6 na inflamação aguda pode ser necessária para uma resposta imune eficaz na imunidade inata.

5.3.3 Interleucina - 10 (IL-10)

A concentração de IL-10 no lavado peritoneal dos animais submetidos à sepse letal por CLP e tratado com *P. acnes* inativado é mostrada na figura 8. O tratamento profilático com *Imunoparvum*[®] diminuiu significativamente a concentração de IL-10 quando comparado ao controle ($718,80 \pm 47,52$ pg/mL vs. $1837,41 \pm 173,87$ pg/mL).

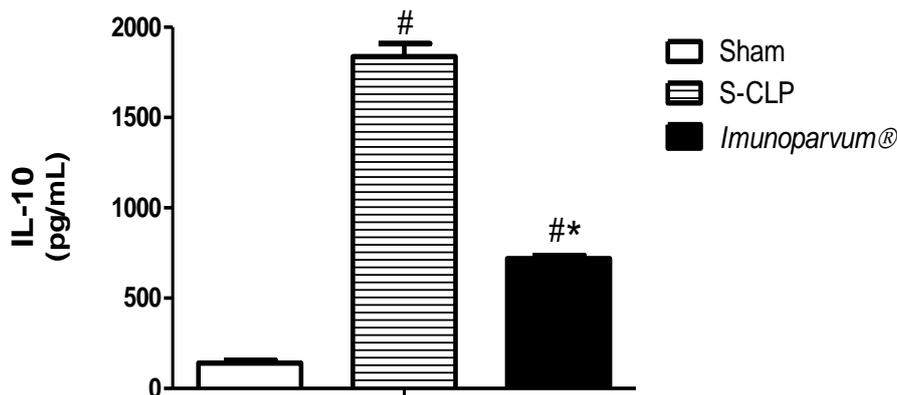


Figura 8. Efeito do pré-tratamento com *Imunoparvum*[®] em animais (n=8) na expressão de IL-10 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de IL-10 na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais. Resultados expressos como média \pm S.E.M [#] $p \leq 0,05$ quando comparados com o grupo *Sham* (n=6). * $P \leq 0,05$ quando comparado com o grupo controle (n=6) pelo teste de Bonferroni.

O papel funcional da IL-10 na mortalidade de animais nos modelos experimentais de sepse apresenta resultados conflitantes. A administração da citocina exógena, anticorpos anti-IL-10, o uso de animais deficientes para IL-10 melhora, piora ou não tem efeito sobre a sobrevivência de camundongos sépticos por LPS ou em outros modelos de sepse dependendo do tempo de administração e o modelo usado (SMITH, 1994; PERL et al., 2007; ZHANG, 2009).

Em modelo de endotoxemia letal a administração de IL-10 é benéfica. No entanto, o pré- ou pós- tratamento com IL-10 em sepse por CLP não é eficaz, aumentando a morbidade e mortalidade. Além disso, a administração de IL-10 exógeno após CLP não regulou TNF- α e IL-6 no plasma ou líquido peritoneal (VAN DER POLL et al. 1995; ROGY et al., 1995; REMICK et al., 1998). Kabay et al., (2007) pré-trataram animais com IL-10 na indução de sepse e não observaram efeito no sequestro de neutrófilos para os pulmões ou peritônio.

Kalechman et al., (2002) mostraram os benefícios da redução dos níveis de IL-10, o tratamento com AS101, um composto não tóxico, restaurou o equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias, melhorando a depuração bacteriana e diminuindo falha múltipla de órgãos em animais com sepse. Este estudo corrobora com os nossos

resultados, onde a diminuição da IL-10 mostrou efeitos benéfico nos animais tratado com Imunoparvum®, contribuindo para o aumento na sobrevida.

5.3.4 MCP-1

Os resultados das concentrações de MCP-1 nos grupos *Sham*, S-CLP e tratado com *P. acnes* inativado (figura 9), demonstram claramente uma diminuição na concentração de MCP-1 em animais tratados com o microrganismo inativado ($778,89 \pm 1,24$ pg/mL) em relação ao grupo S-CLP ($1321,98 \pm 3,84$ pg/mL).

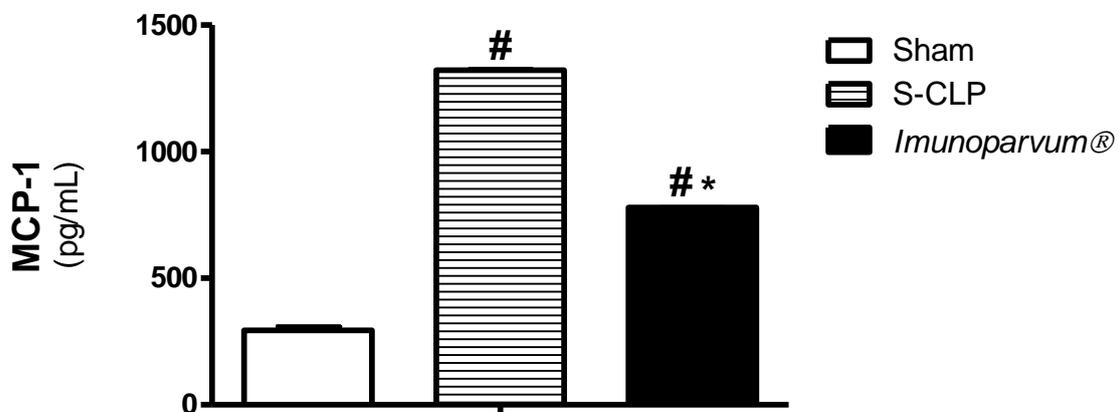


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com *Imunoparvum*® em animais (n=6) na expressão de MCP-1 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal pela CLP. A expressão de MCP-1 na cavidade peritoneal foi avaliada após 6 horas da indução da sepse nos animais. Resultados expressos como média ± S.E.M #p ≤ 0,05 quando comparados com o grupo *Sham* (n=6). * P ≤ 0,05 quando comparado com o grupo controle (n=6) pelo teste de Bonferroni.

A Proteína-1 Quimiotática dos Monócitos (MCP-1) é um quimiocina, protótipo da família CC, envolvida na quimiotaxia e ativação de leucócitos capazes de aumentar a resposta inflamatória. É um mediador essencial no tráfico de monócitos e é sintetizada por macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. A síntese coordenada e liberação de MCP-1 é importante no processo inflamatório agudo e crônico, controlando o fluxo de células fagocíticas, e também o seu estado de ativação em conjunto com citocinas inflamatórias primárias (LABBE et al., 2007; KRAKAUER, BUCKLEY, FISHER, 2010; YAVUZ et al., 2010)

Enquanto a produção de quimiocinas é essencial na resposta do hospedeiro, a super-produção tem mostrado um papel crítico na patogênese da sepse. O sequestro de leucócitos associado à produção excessiva de mediadores inflamatórios são responsáveis na falha múltipla de órgãos e mortalidade na sepse (RAMNATH, 2006). Os níveis de MCP-1 aumentaram em voluntários saudáveis submetidos à endotoxemia experimental (SYLVESTER et al., 1993) e em pacientes sépticos (BOSSINK et al., 1995) e estão relacionados com o pior prognóstico (VERMONT et al., 2006; BOZZA et al., 2007). Bhatia et al., (2005) demonstraram ainda que MCP-1 funciona como um mediador inflamatória na pancreatite aguda.

O papel protetor de MCP-1 na sepse experimental por CLP está associada com o aumento da ativação de neutrófilos e macrófagos (MATSUKAWA et al., 1999) e exerce influência na liberação de citocinas inflamatórias (SPEYER et al., 2004; GOMES et al., 2006). No entanto, tem sido proposto que estratégias anti-MCP-1 possam apresentar potencial terapêutico no tratamento por evitar a interação entre MCP-1 e outros mediadores inflamatórios e o estresse oxidativo de órgãos (RAMNATH et al., 2008; HSING et al., 2010).

A capacidade de inibição de MCP-1 e também TNF- α no lavado peritoneal em resposta a sepse induzida por CLP foram vistas por Reddy et al., (2009) e Kumpers et al., (2011) evidenciando aumento na sobrevivência. Neste estudo, encontramos uma redução nos níveis de MCP-1 e TNF- α no lavado peritoneal, estando de acordo com os resultados encontrados por estes autores.

5.4 Determinação de MPO

Como pode ser visto na figura 10, o tratamento com *P. acnes* inativado não reduziu nas primeiras 6 horas iniciais os níveis de MPO, apresentando semelhança ao grupo controle.

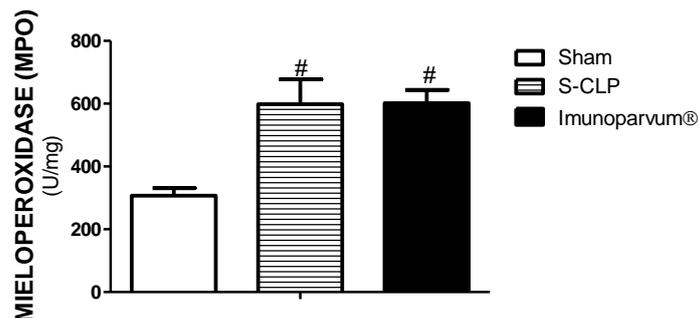


Figura 10. Dosagem de Mieloperoxidase (MPO) no pulmão de animais tratados com *Imunoparvum*[®] (n=6) e submetidos à sepse letal. Os resultados são expressos como U/mg. [#]P<0.05 quando comparado ao grupo Sham(n=6) pelo teste de Bonferroni.

O estresse oxidativo tem um papel importante no desenvolvimento da falência orgânica múltipla e choque séptico. Para medir a migração de neutrófilos no pulmão, foi utilizado o método de quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO), este parâmetro inflamatório indica o acúmulo dos leucócitos polimorfonucleares, uma vez que após a ativação, os neutrófilos migram, rapidamente, para o sítio da infecção, reconhecem, fagocitam e destroem o invasor através da liberação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio produzidas pela ação da mieloperoxidase (ALVES-FILHO et al., 2008).

Foi demonstrado que a administração de linhagens da espécie *P. acidipropionici* reduziram sintomas da inflamação após indução de colite e provocaram redução nos níveis de MPO na mucosa intestinal (MICHEL et al., 2005). Em colite induzida por ácido sulfônico trinitrobenzênico (TNBS), a bactéria *P. freudenreichii* modulou a expressão de citocinas, diminuindo os níveis de TNF- α e reduziu as concentrações de MPO no cólon. No entanto, quando animais foram pré-tratados com *P. freudenreichii* e desafiados com *Citrobacter rodentium*, a resposta inflamatória foi eficaz na redução de sintomas, modulação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, aumento de peso corporal, mas não induziu alteração nos níveis de MPO (FOLIGNÉ et al., 2010). Nossos resultados corroboram com estes autores, pois o pré-tratamento com *P. acnes* modula a resposta inflamatória, mas não altera os níveis de MPO nas primeiras 6 horas depois da CLP.

5.5 Avaliação do *clearance* bacteriano

A avaliação da disseminação bacteriana em animais sépticos tratados com *P. acnes* inativado e do grupo S-CLP foi realizada 6 horas após a indução da sepse letal por CLP. A quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) no lavado peritoneal foi analisada. Como se observa na Figura 11, os animais submetidos à CLP e tratados com *P. acnes* inativado apresentaram uma menor quantidade de UFC. Nossos resultados mostraram que os animais do grupo S-CLP apresentaram deficiência em controlar o foco infeccioso, o que foi evidenciado pela alta concentração de UFC da cavidade abdominal. Animais do grupo *Sham* não apresentaram crescimento bacteriano.

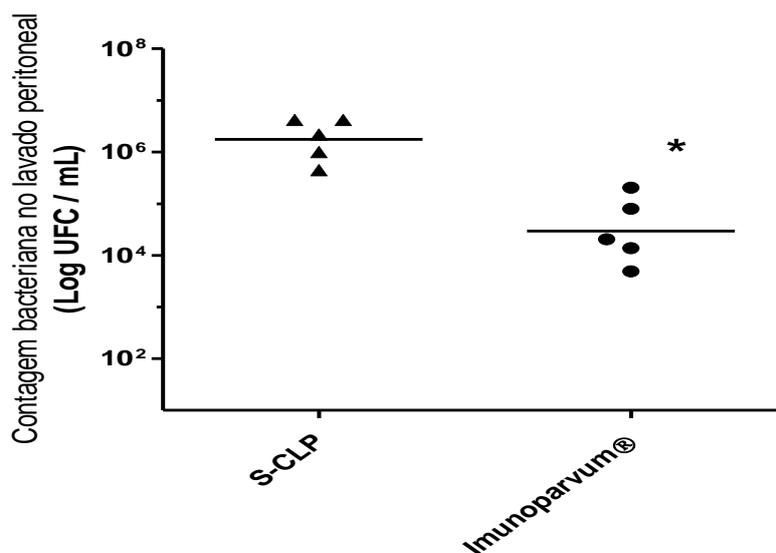


Figura 11. Número de bactérias no lavado peritoneal de animais submetidos à CLP. Os resultados são expressos como Log de UFC/ml. * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (n=5) pelo teste *t*.

O recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso é extremamente importante no controle do crescimento bacteriano e conseqüentemente na prevenção da disseminação de bactérias (ALVES-FILHO et al., 2005). Pode-se inferir que o *Imunoparvum*® proporcionou um intenso recrutamento de neutrófilos durante o processo infeccioso e que essas células conferiram uma capacidade maior para combater bactérias patogênicas na cavidade peritoneal. Estes dados corroboram com Benjamin et

al., (2002) e Crossara-Alberto et al., (2002) em que a diminuição da disseminação bacteriana no foco infeccioso esteve associada aumento da migração de neutrófilos.

O tratamento com *P. acnes* permite o efeito protetor contra o crescimento de diversos microrganismos infecciosos: *Brucella abortus* (ADLAM, BOUGHTON, SCOTT, 1972), *Salmonella enteritidis* (COLLINS, SCOTT, 1974), *Staphylococcus aureus* (DINSMORE et al., 1995), *Klebsiella pneumoniae* (SQUAIELLA et al., 2001), *Listeria monocytogenes* (MOCHIZUKI et al., 2005). Esses achados revelam a capacidade anti-bacteriana em animais desafiados com agentes patogênicos e sensibilizados com *P. acnes* e corroboram com a análise do nossa experimento em que houve diminuição da disseminação bacteriana no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse severa.

É interessante notar que a sobrevida não foi reforçada quando *Imunoparvum*[®] foi administrado logo após a indução de sepse por CLP. No entanto, a combinação de sua atividade antibacteriana inespecífica e uma possível modulação de citocinas parece aumentar a possibilidade de utilização de *Imunoparvum*[®] em conseguir um aumento na sobrevida destes animais.

Analisando nossos dados com os da literatura sugerimos que o efeito benéfico do tratamento com *Imunoparvum*[®] foi acompanhado pela redução dos níveis de TNF- α , MCP-1 e IL-10 e aumento de IL-6, contribuindo para o recrutamento de leucócitos, diminuição do crescimento bacteriano com consequente aumento na taxa de sobrevida. Deste modo, a melhoria da defesa do hospedeiro no foco inicial da infecção pode enfraquecer a resposta inflamatória em outros locais.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O tratamento via intramuscular com *P. acnes* inativado na dose de 40 μ g/animal atuou de modo profilático e associativo na sepse letal induzida por CLP.
- Houve um aumento na migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal nos camundongos pré-tratados com *P. acnes* inativado e submetidos à sepse letal por CLP.
- O tratamento com *P. acnes* inativado diminuiu os níveis de TNF- α , IL-10, MCP-1 no lavado peritoneal de animais submetidos à sepse letal por CLP e aumentou as concentrações de IL-6.
- *P. acnes* inativado não alterou os níveis de MPO no pulmão dos animais submetidos à sepse severa.
- O pré-tratamento com *P. acnes* inativado diminuiu o crescimento bacteriano nos animais submetidos à sepse letal por CLP.

*7. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, FGC; COUTINHO, EM; MONTENEGRO, SML; GOMES, YM; CARVALHO, AB. The use of non-especific immunopotentiators in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, pp. 73-6, 1988.

ADLAM C, BROUGHTON ES, SCOTT MT. Enhanced resistance of mice to infection with bacteria following pre-treatment with *Corynebacterium acnes*. **Nature New Biology**, v. 235, pp. 219-220, 1972.

ALVAREZ S, MEDICINI M, VINTINI E, OLIVER G, RUIZ HOLGADO AP, PERDIGON. Effect of the oral administration of *Propionibacterium acidi-propionici* on IgA levels and on the preveprevention of enteric infection in mice, **Microbiol. Aliment. Nutr**, v.14, pp. 237–243, 1996.

ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 1, pp. 3S-9S, 2008.

ALVES-FILHO, JC; BENJAMIM, C; TAVARES-MURTA, B.M; CUNHA, FQ. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem. Inst. Osw. Cruz**. v. 100, pp. 223-226, 2005.

ALVES-FILHO, JC; FREITAS, A; SPILLER, F; SOUTO, FO; CUNHA, FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30 (S1), pp.3–9, 2008.

ALVES-FILHO, JC; SÔNEGO, F; SOUTO, FO; FREITAS, A; VERRI Jr, WA; AUXILIADORA-MARTINS, M; BASILE-FILHO, A; McKENZIE NA; XU, D; CUNHA, FQ; LIEW, FY. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v. 16, pp. 708–712, 2010.

ANDERSON RN: National Vital Statistics Reports [serial online], v. 50, n. 16, 16 September 2002. [http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr50/nvsr50_16.pdf], acessado em 05 de janeiro de 2012.

ANGUS, DC; LINDE-ZWIRBLE, WT; LIDICKER, J; CLERMONT, G; CARCILLO, J; PINSKY, MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v.29, pp. 1303-1310, 2001

ANGUS, DC; WAX, RS - Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, v. 29, (Suppl7), pp. S109-S116, 2001.

ANNANE D, AEGERTER P, JARS-GUINCESTRE MC, GUIDETFOR B: Current epidemiology of septic shock: The CUB-Réa Network. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, pp. 165-172, 2003.

ANNANE, D; BELLISSANT, E; CAVAILLON, J.M. Septic shock. **Lancet**, v. 365, pp. 63–78, 2005.

AZEVEDO IM, PINHEIRO LAM, TORRES CA, SILVA MAS, GROSSI TRM, FILHO IA, REGO ACM, MEDEIROS VB, CARVALHO MDF, MEDEIRO AC. Effects of perntoxifylline in the treatment of abdominal sepsis in rats. **J Surg CI Res**, v. 1, pp. 33-45, 2010.

BAKER, CC; CHAUDRY, IH; GAINES, HO; BAUE, AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine caecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, pp. 331-335, 1983.

BENJAMIM, C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Med. Ribeirão Preto**, v.34, pp. 18-26, 2001.

BENJAMIM, CF; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Role of oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infect. Dis**, v. 182, pp. 214-223, 2000.

BENJAMIM, CF; SILVA JS; FORTES, ZB; OLIVEIRA, MA; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect. Immun.** V. 70, pp. 3602-3610, 2002.

BHATIA M, RAMNATH RD, CHEVALI L, GUGLIELMOTTI A. Treatment with bindarit, a blocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, pp. G1259–65, 2005.

BONE, RC. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, v.115, pp. 457-469, 1991.

BONE, RC; BALK, RA; CERRA, FB; DELLINGER, RP; FEIN, AM; KNAUS, WA; SCHEIN, RM; SIBBALD, WJ. Definitions for sepsis and oran failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference

Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, pp. 1644-1655, 1992a.

BONE, RC; IBBALD, WJ; SPRUNG, CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, pp. 1481-1483, 1992b.

BOSSINK AW, PAEMEN L, JANSEN PM, HACK CE, THIJS LG, VAN DAMME J. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 and -2 are elevated in human sepsis. **Blood**, v. 86, pp. 3841-7, 1995.

BRAGA, EG; ANANIAS, RZ; MUSSALEM. JS; SQUAIELLA, CC; LONGHINI, ALF; MARIANO, M; TRAVASSOS, LR; LONGO-MAUGÉRI, IM. Treatment with *Propionibacterium acnes* modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. **Immunol Lett**, v.88, pp.163-9, 2003.

BRENER, Z; CARDOSO, JE. Nonspecific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. **J Parasitol**, v. 62, pp. 645-646, 1976.

CARVALHO, PRA; TROTTA, EA. Advances in sepsis diagnosis and treatment. **J Pediatr**, v. 79, n. S2, pp. S195-S204, 2003

CASEY, L. C; BALK, RA; BONE, RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. **Ann. Intern. Med**, v. 119, pp. 771-778, 1993.

CATENACCI, MH; KING, K. Severe sepsis and septic shock: improving outcomes in the emergency department. **Emerg Med Clin North Am**, v. 26, pp.603-2, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL: Increase in national hospital discharge survey rates for septicemia – United States, 1979-1987. **JAMA**, v. 263, pp. 937-938, 1990.

CERVI, L; MacDONALD, AS; KANE, C; DZIERZINSKI, F; PEARCE, EJ. Cutting edge: dendritic cells pulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. **J immunol**, v. 172, pp. 2016-2020, 2004.

CHALUPKA, AN; TALMOR, D. The Economics of sepsis. **Crit Care Clin**, v. 28, p. 57-76, 2012.

CHANG, HJ; LYNM, C; GLASS, RM. Sepsis. **JAMA**, v. 304, n. 16, p. 1856, 2010.

CIANCIARULLO MA, CECCON MEJ, YAMAMOTO L, NEGRO GMBD; OKAY TS. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Rev. bras. crescimento desenvolv. hum**, v.18, n.2, pp. 135-147, 2008.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, pp. 885-891, 2002

COLLINS FM, SCOTT MT. Effect of *Corynebacterium parvum* treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 9, n. 5, pp. 863-869, 1974.

CROSSARA-ALBERTO, DP; DARINI, AL; INOUE, RY; SILVA, JS; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **Br. J. Pharmacol.** v. 136, pp. 645–658, 2002.

CUMMINS, CS; JONHSON, JL. *Corynebacterium parvum*: a synonym for *Propionibacterium acnes*? **J. Gen. Microbiol**, v. 80, pp. 433-442, 1974.

DAMAS, P; LEDOUX, D; NYS, M; VRINDTS, Y; GROOTE D; FRANCHIMONT, P; LAMY, M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. **Ann. Surg**, v. 215, pp. 356–362, 1992.

DAVIS, EG; RUSH, BR; BLECHA, F. Increases in cytokine and antimicrobial peptide gene expression in horses by immunomodulation with *Propionibacterium acnes*. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 4, n. 1, pp. 5-11, 2003.

DEJAGER, L; PINHEIRO, I; DEJONCKHEERE, E; LIBERT C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, pp. 198-208, 2011.

DINARELLO CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest** **112**: 321S-329S, 1997

DINSMORE RP, CATTELL MB, STEVENS RD, GABEL CS, SALMAN MD. Efficacy of a *Propionibacterium acnes* immunostimulant for treatment of Chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. **J Dairy Sci**, v. 78, pp. 1932-1936, 1995.

EJIMA K, LAYNE MD, CARVAJAL IM, KRITEK PA, BARON RM, CHEN Y, et al. Cyclooxygenase-2 deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB J*, v. 17, n. 10, pp. 1325-27, 2003.

FARBER, PA; GLASGOW, LA. Effect of *Corynebacterium acnes* on interferon production in mice. **Infec. Immun.**, v. 6, n. 3, pp. 272-276, 1972.

FERRAZ, AR. Ricardo de Almeida Jorge. Médico e Humanista Portuense, Higienista Intemporal In – **Arquivos de Medicina**, v. 22, n. 2/3, pp. 91-100, 2008.

FETEROWSKI, C.; WEIGHARDT, H.; EMMANUILIDIS, K.; HARTUNG, T.; HOLZMANN, B. Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. **European Journal of Immunology**, v. 31, n.4, p. 1268- 1277, 2001.

FISCHBACH, J; GLASGOW, LA. Effect of *Corynebacterium acnes* on Interferon Production in Mouse Peritoneal Exudate Cells. **Infec. Immun.**, v. 11, n. 1, pp. 80-85, 1975.

FISHER, B; BROWN, A; WOLMARK, N; FISHER, ER; REDMOND, C; WICKERHAM, DL; MARGOLESE, R; DIMITROV, N; PILCH, Y; GLASS, A; SUTHERLAND, C; FOSTER R. Evaluation of the worth of *Corynebacterium parvum* in conjunction with chemotherapy as adjuvant treatment for primaty breast cancer. **Cancer**, v. 66, pp. 220-227, 1990.

FLAMINIO, MJ; RUSH, BR; SHUMAN, W. Immunologic function in horses after non-specific immunostimulant administration. **Vet Immunol Immunopathol**, Amsterdam, v. 63, n. 4, p. 303-315, Jun, 1998.

FOLIGNÉ B, DEUTSCH SM, BRETON J, COUSIN FJ, DEWULF J, SAMSON M, POT B, JAN G. Promising immunomodulatory effects of selected strains of dairy propionibacteria as evidenced in vitro e in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 76, n. 24, pp. 8259-8264, 2010.

FRACASSO, J.F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 29, n.2, p. 119-127, 2008.

FUNKE, G; von GRAEVENITZ, A; CLARRIDGE, JE 3rd; BERNARD, KA. Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, pp. 125-159, 1997.

GARDLUND, B; SJOLIN, J. NILSSON, A; ROLL, M; WICKERTS, CJ; WRETLIND, B. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. **J Infect Dis**, v. 172, pp. 296-301, 1995.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, EJ. Immunomodulatory therapies for sepsis: unexpected effects with macrolides. **Int J Antimicrob Ag**, v. 32S, pp. S39-S43, 2008.

GLASGOW, LA; FISCHBACH, J; BRYANT, SM; KERN, ER. Immunomodulation of host resistance to experimental viral infections in mice effects of *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium parvum*, and *Bacille Calmette-Guérin*. **J Infect Dis**, Chicago, v. 135, n. 5, pp. 763-770, may 1977.

GOMES RN, FIGUEIREDO RT, BOZZA FA, PACHECO P, AMANCIO RT, LARANJEIRA AP, CASTRO-FARIA-NETO HC, BOZZA PT, BOZZA MT. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/CC chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. **Shock**, v. 26, n. 5, pp. 457-463, 2006.

GRIGORYEV E. Compartmentalization of the inflammatory response in abdominal sepsis, **Critical Care**, v. 12, n. S2, pp. 193, 2008

HA, DKK; LAWTON, JWM; GARDNER, ID. The effect of in vitro modulation of macrophage activation on *Mycobacterium lepraemurinum* infection. **J Comp Pathol**, v. 96, pp. 565-573, 1986.

HALL, H; TEUSCHER, C; URIE, P; BODEN, B; ROBISON, R. Induced regression of bovine papillomas by intralesional immunotherapy. **Therapeutic Immunology**, Oxford, v. 1, pp. 319-324, 1994.

HALPERN, BN; PRÉVOT, AR; BIOZZI, G; STIFFEL, C; MOUTON, D; MORARD, JC; BOUTHILLIER, Y; DECREUSEFOND, C. Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial provoqué par *Corynebacterium parvum*. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. I, pp. 77-96, 1963

HALPERN, BN; PRÉVOT, AR; BIOZZI, G; STIFFEL, C; MOUTON, D. Inhibition of tumour growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. **Nature**, v. 212, pp. 853-854, 1966.

HENKIN, CS, COELHO, JC, PAGANELLA, MC, SIQUEIRA, RM, DIAS, FS. Sepsis: uma visão atual. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p 135-145, 2009.

HILL, JO. Modulation of the pattern of development of experimental disseminated Leishmaniasis by *Corynebacterium parvum*. **J Leukoc Biol**, v. 41, pp. 165-169, 1987.

HOTCHKISS, RS; KARL, IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N. Engl. J. Med.** v. 348, pp. 138–150, 2003.

HOWARD, JG; SCOTT, MT; CHRISTIE, GH. 1973. Cellular mechanisms underlying the adjuvant activity of *Corynebacterium parvum*: interactions of activated macrophages with T and B lymphocytes. **Immunopotential**. Ciba Found. Symp, v. 18, pp. 101-120, 1973.

HSING CH, CHOU W, WANG JJ, CHEN HW, YEH CH. Propofol increases bone morphogenetic protein-7 and decreases oxidative stress in sepsis-induced acute kidney injury. **Nephrol Dial Transplant.**, pp.1-11, 2010.

HUTTUNEN, R., AITTONIEMI, J. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. **J Infect**, v. 63, n. 6, pp.407-419, 2011.

JAIMES F. A literature review of the epidemiology of sepsis in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 18, n. 3, pp. 163-171, 2005.

KABAY, B; KOCAEFE, C; BAYKAL, A; ÖZDEN, H, CENGİZ, B; ONER, Z; ÖZGÜÇ, M; SAYEK, I. Interleukin-10 gene transfer: prevention of multiple organ injury in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis. **World J Surg**, v. 31, pp. 105-115, 2007.

KALECHMAN Y, GAFTER U, GAL R, RUSHKIN G, DONGHONG Y, ALBECK M, SREDI B. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. **J. Immunol**, v. 169, pp. 384-392, 2002.

KELLER, R; KEIST, R; JOLLER, PW. Macrophage response to bacteria and bacterial products: modulation on FC γ receptors and secretory and cellular activities. **Immunology**, v. 81, pp. 61-166, 1994.

KENNEDY, JD; SUTTON, RC; CONLEY, FK. Effect of intracerebrally injected *Corynebacterium parvum* on development and growth of metastatic brain tumor in mice. **Neurosurgery**, v. 25, pp. 709-714, 1989.

KIM MS, BAE GS, PARK KC, KOO BS, KIM BJ, LEE HJ, SEO SW, SHIN YK, JUNG WS, CHO JH, KIM YC, KIM TH, SONG HJ, PARK SJ. Myrrh inhibits LPS-induced inflammatory response and protects from cecal ligation and puncture-induced sepsis. **eCAM**, pp. 1-11, 2012.

KIRKLEY, SA. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.5, pp. 652-657, 1999.

KITAGAWA H, YAMANAKA K, KAKEDA M, INADA H, IMAI Y, GABAZZA EC, KUROKAWA I, MIZUTANI H. *Propionibacterium acnes* vaccination induces regulatory T cells and Th1 immune response and improves mouse atopic dermatitis. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 2, pp. 157-158, 2011.

KONO, H.; ROCK, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nature Rev. Immunol**, v. 8, n.4, p.279-289, 2008.

KOPF, M; BAUMANN, H; FREER, G; FREUDENBERG, M; LAMERS, M; KISHIMOTO, T; ZINKERNAGEL, R; BLUETHMANN, H; KOHLER, G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, pp.339-342, 1994.

KOURY, JCA, LACERDA, HR, NETO, AJB. Características da População com sepse em Unidade de terapia intensiva de hospital terciario e privado da cidade do recife. **RBTI**. v.18, n.1, pp. 52-58, 2006.

KOUZNETZOVA, B; BIZZINI, B; CHERMANN, JC; DEGRAND, F; PREVOT, AR; RAYNAUD, M. Immunostimulating activity of whole cells, cell-walls and fractions of anaerobic corynebacteria. In G. Mathe and R. Weiner (ed.), **Recent results in cancer research: investigation and stimulation of immunity in cancer patients**. Springer-Verlag: New York, 1974, pp. 275-293.

KRAKAUER T, BUCKLEY MJ, FISHER D. Pro-inflammatory mediators of toxic shock and their correlation to lethality. **Mediators of inflamm**, pp.1-7, 2010.

KÜMPERS P, GUELER F, DAVID S, SLYKE PV, DUMONT DJ, PARK J, BOCKMEYER CL, PARIKH SM, PAVENSTÄDT, HALLER H, SHUSHAKOVA. The synthetic Tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. **Crit Care**, v. 15:R261, 2011.

LABBE K, DANIALOU G, GUOZDIC D, DEMOULE A, DIVANGAHI M, BOYD JH, PETROF BJ. Inhibition of monocyte chemo attractant protein-1 prevents diaphragmatic inflammation and maintains contractile function during endotoxemia. **Crit Care**, v. 14, n. 5, R187, 2010.

LABRO, R. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, pp.615-650, 2000.

LEE WL, SHALITA AR, SUNTHARALINGAM K, FIKRIG. Neutrophil chemotaxis by *Propionibacterium acnes* Lipase and Its Inhibition. **Infect Immun**, v. 35, n. 1, pp. 71-78, 1982.

LEON, LR; WHITE, AA; KLUGER, MJ. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. **Am. J. Physiol**, v.275, pp. R269-R277, 1998.

LIAUDET, L; MABLEY, JG; SORIANO, FG; PACHER, P; MARTON, A; HASKO, G; SZABÓ, C. Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, pp. 1213–20, 2001

LIMA, HC. Facts and myths about immunomodulators. **An Bras Dermatol**, v. 83, n. 3, pp. 207-221, 2007.

LIPTON, A; HARVEY, HA; BALCH, CM; ANTLE, CE; HECKARD, R; BARTOLUCCI, AA. *Corynebacterium parvum* versus bacille almete-Guérin adjuvant immunotherapy of stage II malignant melanoma. **J Clin Oncol**, v. 9, pp. 1151-1156, 1991

LONGHINI, ANA LEDA FIGUEIREDO. Gliconjugados de *Propionibacterium acnes* com atividade imunomodulatória sobre células peritoneais de camundongos. [Glycoconjugados of *Propionibacterium acnes* with immunomodulatory activities over peritoneals cells of camundongos]. São Paulo: s.n, [82]. ilustab. Dissertação(Mestrado em Ciências)-Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, 2002.

MA, H; KOU, J; ZHU, D; YAN, Y; YU, B. Liu-Shen-Wan, a traditional Chinese medicine, improves survival in sepsis induced by cecaxl ligation and puncture via reducing TNF-alpha level, MDA content and enhancing macrophage phagocytosis. **International Immunopharmacology**, v. 6, pp. 1355-1362, 2006.

MacDONALD, AS; STRAW, AD; BAUMAN, B; PEARCE, EJ. CD8-dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. **J Immunol**, v.167, pp. 1982–8, 2001.

MacDONALD, AS; STRAW, AD; DALTON, NM; PEARCE, EJ. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. **J immunol**, v. 168, pp. 537-540, 2002.

MACIEL, MCG; FARIAS, JC; MALUF, MJ; GOMES, EA; PEREIRA, PVS; ARAGÃO-FILHO, WC; BRAZÃO, JB; COSTA, GC; SOUSA, SM; SILVA, LA; AMARAL, FMM; RUSSO, M; GUERRA, RNM; NASCIMENTO FRF. *Syzygium jambolanum* treatment improve survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicina**, v. 8, n. 57, 2008.

MARIK PE, LIPMAN J. The definition of septic shock: implications for treatment. **Crit Care Resusc**, v. 9, n. 1, pp. 101-103, 2007.

MARSHALL JC, REINHART K. Biomarkers of sepsis. **Crit Care Med**, v. 37, pp. 2290-2298, 2009.

MARTIN, GS; MANNINO, DM; EATON, S; MOSS M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v. 348, pp. 1546- 54, 2003.

MATSUI, K; YOSHIMOTO, T; TSUTSUI, H; HYODO, Y; HAYASHI, N; HIROISHI, K.; KAWADA, N; OKAMURA, H; NAKANISHI, K; HIGASHINO, K. *Propionibacterium acnes* treatment diminishes CD4+NK1.1+ T cells in the liver by

induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. **J. Immunol**, v. 159, pp. 97-106, 1997.

MATSUKAWA, A., HOGABOAM, C.M., LUKACS, N.W., LINCOLN, P.M., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. **J Immunol**. v, 163, pp. .6148-54, 1999.

MAYER, G. *Corynebacterium parvum infectiosum*. **Zentralblatt fiir Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene** (Abteilung I, Originale), v. 98, pp. 370-373, 1926.

MEGID J, KANENO R. Natural killer activity in mice infected with rabies virus and submitted to *P. acnes* (*Propionibacterium acnes*) as immunomodulator. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 23, pp. 91-97, 2000.

MEGID, J; DIAS JUNIOR, JG; AGUIAR, DM. NARDI JÚNIOR, G; SILVA, WB; RIBEIRO, MG. Tratamento da papilomatose canina com *Propionibacterium acnes*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, Belo Horizonte, v.53, n.5, pp. 574-576, 2001.

MICHEL C, ROLAND N, LECANNU G, HERVÉ C, AVICE JC, RIVAL M, CHERBUT. Colonic infusion with *Propionibacterium acidipropionici* reduces severity of chemically-induced clitis in rats. **Lait**, v. 85, pp. 99-111, 2005

MOCHIZUKI H, NOMURA T, KAWAMURA I, MITSUYAMA. Enhanced resistance to gram-positive bacterium and increased susceptibility to bacterial endotoxin in mice sensitized with *Propionibacterium acnes*: involvement of Toll-like receptor. **FEMS Immunol Med Mic**, v. 43, pp. 287-293, 2005.

MOUTA, JUNIOR MF. Aumento da sobrevivência e diminuição da expressão de actina e fibronectina no timo, na sepse tratada com sobrenadante de explante de timo [Dissertação (Mestrado em Ciências)]: São Paulo, [65] - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007.

MOZES, T; BEN-EFRAIM, S; TAK, CJAM; HEILIGERS, JPC; SAXENA, PR; BONTA, IL. Serum levels of tumor necrosis factor determine the fatal or non-fatal course of endotoxic shock. **Immunol. Lett**, v. 27, pp. 157-162, 1991.

NGUYEN, HB; SMITH, D. Sepsis in the 21st century: recent definitions and therapeutic advances. **Am J Emerg Med**, v. 25, pp. 564-571, 2007.

NUSSENZWEIG, R. Increased nonspecific resistance to malaria produced by administration of killed *Corynebacterium parvum*. **Exp Parasitol**, v. 21, pp. 224-231, 1967.

O'CALLAGHAN A, REDMOND HP. Treatment of sepsis: current status of clinical immunotherapy. **Surgeon**, v. 4, n. 6, pp. 355-361, 2006.

OKAMURA, H; TSUTSUI, H; KOMATSU, T; YUTSUDO, M; HAKURA, A; TANIMOTO, T; TORIGOE, K; OKURA, Y; NUKADA, K; HATTORI, K; AKITA, M; NAMBA, F; TANABE, K; KONISHI, S; FUKUDA; KURIMOTO, M. Cloning of a new cytokine that induces INF-g production by T cells. **Nature**, v. 378, pp. 88-91., 1995.

OPAL SM, ESMON CT. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. **Crit Care**, v. 7, pp. 23-28, 2003.

OPAL, SM. News perspectives on immunomodulatory therapy for bacteraemia and sepsis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 36S, pp. S70- S73, 2010.

OPAL, SM; CROSS, AS. Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. **Infect Dis Clin North Am**, v. 13, pp. 285- 97, 1999.

OSAWA R, WILLIAMS KL, SINGH N. The inflammasome regulatory pathway and infections: Role in pathophysiology and clinical implications. **J Infect**, v. 62, pp. 119-129, 2011.

PANACEK, EA; MARSHALL, JC; ALBERTSON, TE; JOHNSON, DH; JOHNSON, S; MacARTHUR, RD; MILLER, M; BARCHUK, WT; FISCHKOFF, S; KAUL, M; TEOH, L; VAN METER, L; DAUM, L; LEMESHOW, S; HICKLIN, G; DOIG, C. Monoclonal anti-TNF: a Randomized Controlled Sepsis Study Investigators. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. **Crit Care Med**, v. 32, pp. 2173-2182, 2004.

PANG Q, DOU L, PAN X, ZENG S, HE J, XU W, ZENG Y. Methylene chloride protects against cecal ligation and puncture-induced acute lung injury by modulating inflammatory mediators. **Int Immunopharm**, v. 10, pp. 929-932, 2010.

PATEL, RT; DEEN, KI; YOUNGS, D; WARWICK, J; KEIGHLEY, MRB. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. **Br. J. Surg**, v. 81, pp. 1306–1308, 1994.

PERL, M., CHUNG, C. S., PERL, U., BIFFI, W. L., CIOFFI, W. G., AYALA, A. Beneficial versus detrimental effects of neutrophils are determined by the nature of the insult. **J. Am. Coll. Surg**. v. 204, pp. 840–853, 2007.

PERRY, AL; LAMBERT, PA. Propionibacterium acnes. **Lett Appl Microbiol**, v. 42, n. 3, p.185-188, 2006

PRÉVOT, A. R; N. D. TAM; H. THOUVENOT. Influence of the cell wall of *C. parvum* strain 946 B on the RES of mice. **C. R. Acad. Sci**, v. 267, pp. 1061-1062, 1968.

PRÉVOT, AR. Recherches sur la flore anaérobies de l'intestin humain: *Acuformis perennis*. **Comptes rendus de la Société Biologique**, Paris 133, pp. 574-577, 1940.

QUEZADO, ZMN; BANKS, SM; NATANSON, C. New strategies for combatting sepsis: the magic bullets missed the mark...but the search continues. **Tibtech**, v. 13, pp. 56-63, 1995.

RAMNATH RD, NG SW, HE M, SUN J, ZHANG H, BAWA MS, et al. Inflammatory mediators in sepsis: cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases. **J Organ Dysfunct**, v. 2, pp. 80-92, 2006.

RAMNATH, RD, WEI NG, S, GUGLIELMOTTI, A, BHATIA, M. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 6, pp. 810-818, 2008.

REDDY, ABM; SRIVASTAVA, SK; RAMANA, KV. Anti-inflammatory effect of aldose reductase inhibition in murine polymicrobial sepsis. **Cytokine**, v. 48, pp. 170–176, 2009.

REDDY, RC; STANDIFORD, TJ. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis. **Curr Opin Hematol**, v. 17, n. 1, pp. 18-24, 2010.

REMICK, DG; GARG, SJ; NEWCOMB, DE; WOLLENBERG, G; HUIE, TK; BOLGOS GL. Exogenous interleukin-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. **Crit Care Med**, v. 26, pp. 895-904, 1998.

REMICK, DG; NEWCOMB, DE; BOLGOS, GL; CALL, DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: Lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 13, n. 2, pp. 110-116, 2000.

RICE, TW; WHEELER, AP; MORRIS, PE; PAZ, HL; RUSSELL, JA; EDENS, TR; BERNARD, GR. Safety and efficacy of affinity-purified, anti-tumor necrosis factor-alpha, ovine fab for injection (CytoFab) in severe sepsis. **Crit Care Med**, v. 34, pp. 2271-2281, 2006.

RIEDEMANN, NC; GUO, RF; WARD, PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. **Nat. Med.** v.9, pp. 517-524, 2003.

RITTIRSCH, D; HUBER-LANG, MS; FLIERL, MA; WARD, PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, pp. 31-36, 2009.

ROGY, MA; AUFFENBERG, T; ESPAT, NJ; PHILIP, R; REMICK, D; WOLLENBERG, GK; COPELAND, EM 3RD; MOLDAWER, LL. Human tumor necrosis factor receptor (p55) and interleukin 10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia and also attenuates local inflammatory responses. **J Exp Med**, v. 181, pp. 2289-2293, 1995.

RUSSELL, J. A. Management of Sepsis. **N. Engl J Med.** v.355, n.16, p.1699-713, 2006.

RUTHES AC, RATTMANN YD, CARBONERO ER, GORIN PAJ, IACOMINI M. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, pp. 1620-1627, 2012.

SALES Jr, JA; DAVID, CM; HATUM, R; SOUZA, CSP; JAPIASSU, A; PINHEIRO, CTS; FRIEDMAN, G; SILVA, OB; DIAS, MDA; KOTERBA, E; DIAS, FS; PIRAS, C. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Rev Bras Ter Intensiva**, v.18, pp. 9-17, 2006.

SALOMAA, ER; PULKKI, K; HELENIU, H. Pleurodesis with doxycycline or *Corynebacterium parvum* in malignant pleural effusion. **Acta Oncol**, v. 34, pp. 117-121, 1985.

SCHEINGRABER, S; BAUERFEIND, F; BÖHME, J; DRALLE, H. Limits of peritoneal cytokine measurements during abdominal lavage treatment for intraabdominal sepsis. **American Journal of surgery**, v. 181, n. 4, pp. 301-308, 2001.

SCHOTTMUELLER, H. Wesen und Behandlung der Sepsis. Verhandl Dtsch Kongress **Innere Med.** v. 31, p.57-280, 1914.

SILVA, E; PEDRO, MA; SOGAYAR, AC; MOHOVIC, T; SILVA, CLO, JANISZEWSKI, M; CAL, RGR; SOUSA, EF; ABE, TP; ANDRADE, J; MATOS, JD; REZENDE, E; ASSUNÇÃO, M; AVEZUM, A; ROCHA, PCS; MATOS, GFJ; BENTO, AM; CORREA, AD; VIEIRA, PCB; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, v. 8, pp. R251-R260, 2004.

SMITH, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **J. Leukoc. Biol.** v. 56, pp. 672–686, 1994.

SMITH, WD. Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. **Res Vet Sci**, v.54, pp. 94-101, 1993.

SPEYER CL, GAO H, RANCILIO NJ, NEFF TA, HUFFNAGLE GB, SARMA JV, et al. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. **Am J Pathol**, v. 165, pp. 2187-2196, 2004.

SQUAIELLA, C.C; BRAGA, EG; ANANIAS, RZ; LONGHINI, ALF; MUSSALEM, JS; SILVA, RM; LONGO-MAUGÉRI, IM. Effect of the mice treatment with *Propionibacterium acnes* on the specific response and activity of immune system cells on the *Klebsiella pneumoniae* infection. **Anais do IX Congresso de Iniciação Científica – PIBIC**, p. 7, 2001.

SQUAIELLA, CC; ANANIAS, RZ; MUSSALEM, JS; BRAGA, EG; RODRIGUES, EG; TRAVASSOS, LR; LOPES, JD; LONGO-MAUGÉRI, IM. In vivo and in vitro effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on mouse bone marrow stem cells and dendrite cell differentiation. **Immunobiology**, v. 211, pp. 105-116, 2006.

SYLVESTER I, SUFFREDINI AF, BOUJOUKOS AJ, MARTICH GD, DANNER RL, YOSHIMURA T, et al. Neutrophil attractant protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human serum. Effects of intravenous lipopolysaccharide on free attractants, specific IgG autoantibodies and immune complexes. **J Immunol**, v. 151, pp.3292–8, 1993.

TAVARES-MURTA, BM; MACHADO, JS; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, v. 25, pp. 247–253, 2001.

TEIXEIRA KM, COUTINHO EM, ABATH FGC, MONTENEGRO SML. Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *Schistosoma mansoni* infection. II *Corynebacterium parvum*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 38, pp. 359-363, 1996.

THIJS, LG; HACK, CE. Time course of cytokine levels in sepsis. **Intensive Care Med**, v. 21, pp. 258-263, 1995.

TSUJI, H; MUKAIDA, N; HARADA, A; KANEKO, S; MATSUSHITA, E; NAKANUMA, Y; TSUTSUI, H; OKAMURA, H; NAKANISHI, K; TAGAWA, Y; IWAKURA, Y; KOBAYASHI, K; MATSUSHIMA, K. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed INF-g-deficient mice by a concomitant reduction of TNF-a, IL- 12 and IL-18 production. **J Immunol**, v. 162, pp. 1049–1055, 1999.

UNDERHILL DM. Macrophage recognition of zymosan particles. **J Endotoxin Res**, v. 9, n. 3, pp. 176-180, 2003.

VAN DER POLL, T. Immunotherapy of sepsis. **Infectious Diseases**, v.1, pp. 165-174, 2001.

VAN DER POLL, T. SAUERWEIN; HP. Tumor necrosis factor-alpha: its role in the metabolic response to sepsis. **Clin Sci**, v. 84, pp. 247-256, 1993.

VAN DER POLL, T; LEVI, M; HACK, CE; TEN CATE, H; VAN DEVENTER, SJ; EERENBERG, AJ; GROOT, ER; JANSEN, J; GALLATI, H; BULLER, HR. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. **J. Exp. Med**, v. 179, pp. 1253, 1994.

VAN DER POLL, T; MARCHANT, A; BUURMAN, WA; BERMAN, L; KEOGH, CV; LAZARUS, DD; NGUYEN, L; GOLDMAN, M; MOLDAWER, LL; LOWRY, SF. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **J Immunol**, v. 155, pp. 5397-40, 1995.

VAN KAMPEN, KR. Immunotherapy and Cytokines. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, Orlando, v. 12, n. 3, pp. 186-192, aug, 1997.

VILLA, P; SACCANI, A; SICA, A; GHEZZI, P. Glutathione protect mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. **J Infect Dis**, v. 185, pp. 1115-1120, 2002.

VINCENT, JL, SAKR, Y., SPRUNG, C., RANIERI, V., REINHART, K., GERLACH, H, MORENO R, CARLET J, LE GALL JR, PAYEN D. Sépsis in European intensive care units: results of the SOAP study. **Crit Care Med**, v.34, n. 2, pp. 344-353, 2006.

VINSON, RB; CARROLL, JL; PRUETT, SB. Mechanism of suppressed neutrophil mobilization in a mouse model for binge drinking: role of glucocorticoids. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 275, pp. R1049-R1057, 1998.

WATSON, SR; SLJIVIC, VS. The role of macrophages in the adjuvant effect on antibody production of *Corynebacterium parvum*. **Clin. exp. Immunol**, v. 23, pp. 149-153, 1976.

WEBSTER, G.F. Inflammatory acne. **Int J Dermatol**, v. 29, pp. 313-317, 1990.

WEISS, RC; COX, NR. Effect of interferon or *Propionibacterium acnes* on the course of experimentally induced feline infectious peritonitis in specific-pathogen-free and random-source cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 51, n. 5, pp. 726-733, may 1990.

WOODRUFF, MFA; McBRIDE, WH; DUNBAR, N. Tumour growth, phagocytic activity and antibody response in *Corynebacterium parvum*-treated mice. **Clin. Exp. Immunol**, v. 17, pp. 509-518, 1974.

YAVUZ T, KAYA D, BEHÇET M, OZTURK E, YAVUV O. Effects of melatonin on *Candida* sepsis in a experimental rat model. **Adv Ther**, v. 24, n. 1, pp. 91-100, 2007.

YONEYAMA, H; MATSUNO, K; ZHANG, Y; MURAI, M; ITAKURA, M; ISHIKAWA, S; HASEGAWA, G; NAITO, M; ASAKURA, H; MATSUSHIMA, K. et al. Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. **J Exp Med**, v. 193, pp. 35–49, 2001.

ZANON, F, CAOVIOLA, JJ, MICHEL, RS, CABESA, EV, CERETTA, DF, LUCKEMEYER, GD, BELTRAME, CPOSENATTO, N. Sepsis na Unidade de Terapia Intensiva: etiologias, fatores prognósticos e mortalidade. **RBTI**, v.20, n.2, pp 128-134, 2008.

ZANOTTI-CAVAZZONI, SL; GOLDFARB, RD. Animal models of sepsis. **Crit Care Clin**, v. 25, pp. 703–719, 2009.

ZHANG, X., MAJLESSI, L., DERIAUD, E., LECLERC, C., LO-MAN, R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. **Immunity**, v. 31, pp. 761–771, 2009.

ZHANG, Y; YONEYAMA, H; WANG, Y. Mobilization of dendritic cell precursors into the circulation by administration of MIP 1-a in mice. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, pp. 201-9, 2004.

ANEXO B

Propionibacterium acnes inactivated attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis by modulating inflammatory factors

JOSE BRUNO NUNES FERREIRA SILVA^{1,2}, SAMARA KELLY MENDONÇA DE OLIVEIRA¹, INGRID DE ARAUJO CAMPOS^{1,2}, CARLSON HELDER REIS DE CARVALHO JÚNIOR¹, TIAGO DA CUNHA COUTINHO¹, TERESINHA GONÇALVES DA SILVA^{1,2*}

¹Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos –Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial- Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil.

***Corresponding author:** Teresinha Gonçalves da Silva, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE - Brasil

Fone: 55-81-21268347 / Fax: 55-81-21268346

E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

ABSTRACT

Sepsis is a systemic inflammation associated with infection caused by pathogenic micro-organisms with high mortality rates. In this study, we investigated the protective effect of *Propionibacterium acnes*-killed against polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). After CLP, the animals were kept to assess the survival rate. 6 h after CLP some animals were euthanized to evaluate the effect of intramuscular injection of *P. acnes* in the inflammatory response determined by TNF- α , IL-6, IL-10 and MCP-1 levels in the peritoneal lavage of animals. Bacterial counts and cell migration were performed to verify the innate immune response. Prophylactic treatment with *P. acnes* increased the survival of the animals, followed by a significant decrease in the TNF- α , IL-10 and MCP-1 levels, 6 h after CLP. Furthermore, *in vivo* administration reduced the number of bacteria in the peritoneal cavity with increased migration of leukocytes, especially neutrophils. Thus, *P. acnes* promoted increased survival rate of animals with sepsis, in part attributed to its immunomodulatory properties, against pathogenic microorganisms, as well as better control of infection by reducing bacterial counts. These findings suggest that treatment with *P. acnes* has potent prophylactic effect and antiseptic associated with leukocyte migration to the infection, with subsequent reduction of colony forming units and immunomodulation of inflammatory mediators.

Key words: *Propionibacterium acnes*, immunomodulation, sepsis severe, cellular migration, cytokines

INTRODUCTION

Sepsis is a systemic inflammation associated with infection caused by pathogenic microorganisms. Gram-negative and gram-positive bacteria, viruses and fungi are responsible for the excessive stimulation of immune system activation and deregulate the protective response of the host [1]. Sepsis remains a clinical problem in the XXI century. It is a common condition in developing and developed countries. The increased incidence and mortality has evolved substantially over the past two decades, particularly in intensive care units [2-4]. Despite the intense treatment to contain the infection in patients with sepsis, the use of drugs has not been satisfactory in clinical applications, resulting in a significant impact on health systems around the world, both economically and socially [5].

The immunomodulation in sepsis has evolved in recent years, stimulating research centers in the search for therapeutic targets capable of containing the hyperactivity of the host immune system [6-8]. The intervention immune based on the pathophysiology of sepsis that causes the stimulation of intracellular signaling pathways leading to the gene expression of pro and anti-inflammatory, including TNF- α , IL-6, IL-10 and MCP-1 [9,10]. It has been proposed that the therapeutic management using immunomodulators is effective in infection because of its importance in the activation of cell populations and in the stimulation or suppression of immune mediators [11,12].

Propionibacterium acne, formerly known as *Corynebacterium parvum* is a gram-positive anaerobic microorganism belonging to the skin human adjuvant widely used in clinical trials, however, a suitable candidate for therapeutic approach. The bacillus has been used as a tool for studies of cellular immune response due to its

immunomodulatory effects [13]. The inactivated bacteria promotes Th1 [14,15] and Th2 [16] response in mice, induces tumoricidal activity [17,18], increases resistance to viral infections [19], parasitic [20-25], has bacterial activity [26,27] and has an important relationship with the activation of cell populations [28-31]. More recently been shown that treatment using *P. acne*-killed prevented the clinical manifestations of atopic dermatitis in animals [32]. In clinical studies, administration i.m. of *P. acnes* as an adjunct in the treatment of multibacillary leprosy reduced the amount of bacilli in lepromatous and borderline lepromatous forms of the disease and improved the patients' response to anti-bacterial [33]. Although there are studies describing the immunomodulatory and antibacterial properties of *P. acnes*, we found no reports of its effect on sepsis polimicrobiana. Thus, the objective of this study was to investigate the effects of *Propionibacterium acnes*-killed in lethal sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP).

MATERIAL E MÉTODOS

Experimental Animals

Male *Mus musculus* mice provided by the animal facilities of Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, Brazil, were used for the evaluation of the *P. acnes*-killed in sepsis. The mice used weighed between 20 and 25 g and were kept in a room with controlled temperature (22 ± 2 °C), humidity (50–60%) and a 12 h/12 h light/dark cycle. Water and food were made available to the animals without restriction. Before beginning the experiments, animals were acclimated to the laboratory environment for at least 30 min. The Animal Studies Committee of the Federal University of

Pernambuco approved the experimental protocols (number 23076.039440/2011-30). The animals were treated according to the ethical principles of animal experimentation of SBCAL (*Brazilian Society of Laboratory Animal Science*) and the norms of the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Drugs and reagents

Propionibacterium acnes killed were produced by Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil). Other drugs and reagents used in this study were as follows: Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories, USA). TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1 (eBioscience, San Diego, California, USA).

Experimental design

Polymicrobial sepsis was induced using cecal ligation and puncture (CLP) according to previously described methods [34, 35]. After deep anesthesia, midline laparotomy was performed with exposure of cecum followed of ligation and one transverse perforation of the same, with a needle 18G, for induction of sepsis lethal. After surgery, the cecum of the animals was replaced into peritoneal cavity, and it was closed in two layers with suture of 4-0 nylon. Immediately after surgery, each animal received a subcutaneous injection of a 1 mL of saline solution as fluid resuscitation.

The animals were initially divided into 3 groups that were treated by intramuscular route in 1, 3, 5, 7 days before the CLP induction. The control group animals (G-1) received vehicle (saline solution 0.9%) and the animals of the group 2 (G-2) received the *Propionibacterium acnes* inactivated constituted with 4mg/2mL of *P. acnes* at a dose

of 0.2 mL (0.4 mg) per animal. In the sham-operated group (G-3), underwent identical laparotomy but without cecum puncture and the mice were not treated. The G-1, G-2 and G-3 animals were examined for survival rate. The animals was assessed every 6 h for 96 h after CLP performed. Six hours after CLP, peritoneal lavage fluids were collected to leukocyte and neutrophil migration, cytokine levels and determination of colony-forming units (CFUs).

Cellular migration

Six hour after CLP, eight animals of each group were euthanized, and the cells present in theperitoneal cavity were harvested by introducing 3 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 Mm of EDTA. Total white blood cells (WBC) count was performed by using an automatic counter (ABX Micros 60), and differential cell counts were carried out on cytocentrifuge slides (Cytospin 3; Shandon Southern Products, Astmoore, United Kingdom), stained by the panotic dye. The results were expressed as the number of cells per cavity.

Determination of cytokines in peritoneal lavage

The exudates collected from the peritoneal cavity were stored in a freezer at -20°C for the determination of cytokine levels. Quantification of the TNF- α , IL-6, IL-10 and MCP-1 levels in these exudates was performed by sandwich ELISA using kits that were specific for mice according to the manufacturer's instructions (*eBioscience*, San Diego, California, USA).

Determination of bacterial counts

Bacterial counts were performed on aseptically obtained peritoneal fluid. At 6 h after CLP, mice were sacrificed and the skin of abdomen was cut open in the midline without injury to the muscle. Samples were serially diluted from 1:100 to 1:1000 and 1:10000 in PBS and cultured on Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories) plates. Colony-forming units were counted after 18–24 h incubating 32 °C and the results were expressed as \log^{10} of the number of colony-forming units per mL peritoneal fluid.

Statistical analysis

All results were expressed as mean values \pm standard deviation for each experimental group. Statistical analysis between groups was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni's test and *test t* to determine statistical difference in *antibacterial activity*. For a confidence interval of 95%, P values less than 0.05 ($P < 0.05$), as determined using GraphPad Prism software (version 5.0), were considered to be indicative of statistical significance.

RESULTS

Effect of *P. acnes* on the survival of animals subjected to lethal sepsis by CLP

As shown in Figure 1, CLP induced the death of 100% of control animals 36 hours after surgery. The reduction in mortality was significant in the animals receiving treatment with *P. acnes*. The rate of the treated group was 50% at 96 hours after CLP.

Effect of treatment with *P. acnes* in cell migration into the peritoneal cavity after inducing lethal sepsis by CLP

A significant increase in the total number of leukocytes in the peritoneal cavity of the treated group *Q. acnes* ($9.64 \pm 2.70 \times 10^6$ leukocytes / well) in the control group ($6.00 \pm 2.00 \times 10^6$ leukocytes /cavity) (Figure 2). The sham group showed leukocyte migration of $3.40 \pm 0.60 \times 10^6$ leukocytes/cavity. The recruitment of neutrophils into the peritoneal cavity increased in the group of animals that received *P. acnes* compared with the control group.

Effect of *P. acnes* levels of TNF- α , IL-6, IL-10 and MCP-1

Figure 3 shows the concentrations of TNF- α , IL-6, IL-10 and MCP-1 in the peritoneal exudate of the groups treated with *P. acnes*, sham control and 6 h after surgery. The levels of TNF- α , IL-10 and MCP-1 showed a decreased in animals treated with *P. acnes* compared with the control group. In contrast, IL-6 were not abolished by treatment with *P. acnes* displayed high concentration after 6 hours PLC.

Effect of bacterial count in the peritoneal cavity of animals subjected to CLP and treated with *P. acnes*.

To evaluate the effect of *P. acnes* in control of infection, we investigated the number of bacteria in the peritoneal cavity of animals subjected to lethal sepsis by CLP. We have detected that 6 hours after surgery the animals in the control group showed deficiency control the infection, which was evidenced by the high concentration of CFU of the abdominal cavity. The number of bacteria found in the peritoneal cavity of the treated group was lower than the values found in control animals. The sham group had no CFU 24 hours after surgery (Figure 4).

DISCUSSION

This study demonstrated that the protective action of *Propionibacterium acnes* modulates the inflammatory response in animals subjected to lethal sepsis by CLP. When the animals received an intramuscular injection of *P. acnes* and underwent severe sepsis there was a reduction in mortality, conferring resistance to infection. In this study we have observed a survival rate of 100% in the first 24 hours after surgery in the treated group. Moreover, mice treated with *P. acnes* are highly susceptible to lethal endotoxemia, with high mortality rates in the first 24 hours due to the release of high concentrations of TNF- α , IL-12 and INF- γ in response to lipopolysaccharide (LPS) [36,37]. However, Echtenacher et al. pretreated with *P. acnes* intravenously wildtype and deficient INF- γ - / - and observed no significant differences in mortality of these groups in severe sepsis induced by CLP [38]. The authors considered the positive action of *P. acnes* which can mask the negative effects of proinflammatory cytokines INF- γ and IL-12, unlike the susceptibility to death from sensitized animals with bacteria and challenged with LPS [38]. As reported previously models of sepsis induction by LPS and CLP exhibit the same degree of mortality [39]. We used an experimental model most frequently performed in scientific research. CLP is a murine model of polymicrobial sepsis similar to the progression and characteristics of human sepsis that has contributed to the knowledge of the involvement of components of innate immunity, including the identification of new potential therapeutic targets [40]. In this study pretreatment did not exert a deleterious effect after CLP. The sensitivity of animals treated with *P. acnes* is not restricted to gram-negative bacteria by LPS, but also to gram-positive bacteria such as *Listeria monocytogenes* [41]. Some studies have reported the antibacterial activity of *P. acnes* against gram - positive and gram - negative [42-44].

In sepsis failure of neutrophil migration to the infectious site has been found and is associated with a large deficit in the control of infection, leading to increased bacterial

dissemination and inducing a high mortality rate [45]. The neutrophil migration to the site of infection is extremely important for the control of bacterial growth and consequently for the prevention of bacterial dissemination [46]. *P. acnes* has worked in the modulation of macrophages [28], eosinophils [16], neutrophils [47,48], dendritic cells [49,50] and natural killer cells [30]. This study demonstrated that the increase in animal survival was accompanied by an increase in migration of cells into the peritoneal cavity and significant decreased in colony forming units of the group treated with *P. acnes*. Vinson et al. Observed the recruitment of neutrophils into the peritoneal cavity when animals were stimulated with *P. acnes*. Our results clearly showed the action of *P. acnes* on leukocytes and neutrophils [48]. These results suggest that *P. acnes* shows antibacterial activity is not specific polymicrobial sepsis model, increasing the elimination of bacteria, related to the increase of leukocyte migration into the peritoneum and improving the function of peritoneal neutrophils from these animals.

The expression of inflammatory mediators is the host response to infection. In sepsis, the over expression of proinflammatory cytokines has deleterious effects on the body, disrupt the immune system and is involved in multiple organ dysfunction [51]. TNF- α is one of the mediators responsible for organ dysfunction and increased mortality during severe sepsis [53]. Some studies have reported that increasing the survival rate is following the decrease of TNF- α [6, 8]. Thus, immunotherapy focus of sepsis in blocking TNF- α is promising in animal models. This study assessed the effect of *P. acnes* on the concentration of TNF- α in the peritoneal cavity 6h after CLP and there was a significant reduction in levels of this marker. Similar results were found in peritoneal fluid by Reddy et al. [52] that inhibited aldose reductase, a key mediator in oxidative stress-induced activation of NF- κ B and inflammatory cytokines, and Panget al. [54] that evaluated the modulating effect of dichloromethane in animals with sepsis and reported a decrease in TNF- α and consequent

increase in survival. Another study found that the decrease in concentration of TNF- α in serum and peritoneal exudate of animals treated with myrrh, an essential oil obtained from species of the genus *Commiphora*, increased survival in severe sepsis [55]. Recently it was shown the immunomodulatory activity of a polysaccharide of *P. acnes* on reducing TNF- α in animals with focal segmental glomerulosclerosis [56 *in press*].

The monocyte chemoattractant protein (MCP-1) is a CXC chemokine belonging to the subfamily that stimulates the migration of monocytic cells and is associated with protection in experimental sepsis with activation of neutrophils and macrophages [57]. The coordinated synthesis and release of MCP-1 is important in acute and chronic inflammatory processes by controlling the influx of phagocytic cells and also activation of the release of inflammatory cytokines [58, 59]. The decrease of the concentration of MCP-1 in animals treated with *P. acnes* and subjected to severe sepsis. These findings corroborate studies by Kümpers et al. [60], where they observed a reduction in the levels of TNF- α and MCP-1 in peritoneal fluid of animals after surgery. It has also been shown that blocking the activity of MCP-1 protein in animals sensitized with *P. acnes*-killed induced the decreased concentrations of TNF- α and IL- β [61]. In this study, the levels of TNF- α and MCP-1 are reduced. Moreover, the chemokine MCP-1 has been an important factor in the recruitment of neutrophils [58]. Probably other mediators are involved in the recruitment of neutrophils into the peritoneal cavity of animals treated with *P. acnes* and subjected to polymicrobial sepsis. In fact, the lethality of animals deficient for MCP-1/CCL-2 $^{-/-}$ is not related to bacterial growth [59]. Recently, strategies, anti-MCP-1 have been suggested as a potential therapeutic for the treatment of sepsis and endotoxemia by preventing the interaction between MCP-1 and other inflammatory mediators and oxidative stress in organs [62, 63].

In this study, the data showed no decrease in the concentration of IL-6 following treatment with *P. acnes*. Increased IL-6 levels after stimulation with *P. acnes* has been reported [64,65]. Moreover, *P. acnes* also decreases IL-6 concentrations [66]. The presence of high levels of serum IL-6 in treated animals *P. acnes* endotoxemia is not directly correlated with increased sensitivity to LPS and has no role as a mediator of lethal endotoxemia [36]. Mice deficient for IL-6 showed no improvement in survival [67]. In addition to administration of high doses of anti-IL-6 or lower doses of antibody did not increase survival of animals with sepsis. This suggests that excessive levels of IL-6 are detrimental and that the lock does not help the survival of these animals [68]. Although *P. acnes* modulate the expression of IL-6, increasing its concentration in this experimental model, we believe that the presence of a balanced concentration of IL-6 in acute inflammation may be required for an effective immune response in innate immunity. Therefore, further analyzes are needed to clarify this issue.

Notably, pre-treatment of *P. acnes* suppressed the production of IL-10 in the peritoneal cavity. The cytokine IL-10 appears to be crucial in regulating the production of proinflammatory cytokines [69]. In a previous study, administration of IL-10 reduced the levels of TNF- α and increased survival of animals endotoximêmicos [70]. However, this was not the case with our study, because the treatment with *P. acnes* and reduces IL-10 also decreased TNF- α and MCP-1 after PLC. It is believed that the role of IL-10 in polymicrobial sepsis or its interaction with proinflammatory cytokines may therefore be more complex. The decreased expression of IL-10 is associated with increased survival by restoring the host immune response [71] and the decrease of CFUs in animals subjected to CLP [72, 73]. Recently it was suggested that neutralization of IL-10 decreases the percentage of Treg CD4 + T cells and increases

the survival of septic animals [74]. Thus, it is suggested that the reduced levels of IL-10 in this study was beneficial in protecting against polymicrobial sepsis.

Finally, the data obtained in this study show that the beneficial effect of treatment with *P. acnes* in the survival rate of animals was accompanied by reduced levels of TNF- α , MCP-1 and IL-10 and IL-6 increases, contributing to leukocyte recruitment and reduced bacterial growth. Along these lines, it suggests that the improvement of host defense in the initial focus of infection can weaken the inflammatory response in other places.

CONCLUSION

This study showed that treatment with *P. acnes*-killed reduced mortality of animals. PLC and this effect may be due to modulation of pro- and anti-inflammatory regulating the production and release of these mediators in inflammation.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support by CAPES and CNPQ.

REFERENCES

- [1] HUTTUNEN, R., AITTONIEMI, J. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. **J Infect**, v. 63, n. 6, pp.407-419, 2011.

- [2] ANGUS, DC; LINDE-ZWIRBLE, WT; LIDICKER, J; CLERMONT, G; CARCILLO, J; PINSKY, MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v.29, pp. 1303-1310, 2001.
- [3] SILVA, E; PEDRO, MA; SOGAYAR, AC; MOHOVIC, T; SILVA, CLO, JANISZEWSKI, M; CAL, RGR; SOUSA, EF; ABE, TP; ANDRADE, J; MATOS, JD; REZENDE, E; ASSUNÇÃO, M; AVEZUM, A; ROCHA, PCS; MATOS, GFJ; BENTO, AM; CORREA, AD; VIEIRA, PCB; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, v. 8, pp. R251-R260, 2004.
- [4] JAIMES F. A literature review of the epidemiology of sepsis in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 18, n. 3, pp. 163-171, 2005.
- [5] CHALUPKA, AN; TALMOR, D. The Economics of sepsis. **Crit Care Clin**, v. 28, p. 57-76, 2012. doi:10.1016/j.ccc.2011.09.003
- [6] MA, H; KOU, J; ZHU, D; YAN, Y; YU, B. Liu-Shen-Wan, a traditional Chinese medicine, improves survival in sepsis induced by cecaxl ligation and puncture via reducing TNF-alpha level, MDA content and enhancing macrophage phagocytosis. **International Immunopharmacology**, v. 6, pp. 1355-1362, 2006.
- [7] YUN, N, LEE, C, LEE, S. Protective effect of Aloe vera on polymicrobial sepsis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, pp.1341-1348, 2009.
- [8] MACIEL, MCG; FARIAS, JC; MALUF, MJ; GOMES, EA; PEREIRA, PVS; ARAGÃO-FILHO, WC; BRAZÃO, JB; COSTA, GC; SOUSA, SM; SILVA, LA; AMARAL, FMM; RUSSO, M; GUERRA, RNM; NASCIMENTO FRF. Syzygium

jambolanum treatment improve survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicina**, v. 8, n. 57, 2008.

[9] HOTCHKISS, RS; KARL, IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N. Engl. J. Med.** v. 348, pp. 138–150, 2003.

[10] GIAMARELLOS-BOURBOULIS, EJ. Immunomodulatory therapies for sepsis: unexpected effects with macrolides. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32S, pp. S39-S43, 2008.

[11] O'CALLAGHAN A, REDMOND HP. *Treatment of sepsis: current status of clinical immunotherapy*. *Surgeon*, v. 4, n. 6, pp. 355-361, 2006

[12] OPAL, SM. News perspectives on immunomodulatory therapy for bacteraemia and sepsis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36S, pp. S70- S73, 2010.

[13] PERRY, AL; LAMBERT, PA. *Propionibacterium acnes*. **Lett Appl Microbiol**, v. 42, n. 3, p.185-188, 2006

[14] MATSUI, K; YOSHIMOTO, T; TSUTSUI, H; HYODO, Y; HAYASHI, N; HIROISHI, K.; KAWADA, N; OKAMURA, H; NAKANISHI, K; HIGASHINO, K. *Propionibacterium acnes* treatment diminishes CD4+NK1.1+ T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. **J. Immunol**, v. 159, pp. 97-106, 1997.

[15] CERVI, L; MacDONALD, AS; KANE, C; DZIERSZINSKI, F; PEARCE, EJ. Cutting edge: dendritic cells compelled with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. **J immunol**, v. 172, pp. 2016-2020, 2004.

- [16] BRAGA, EG; ANANIAS, RZ; MUSSALEM. JS; SQUAIELLA, CC; LONGHINI, ALF; MARIANO, M; TRAVASSOS, LR; LONGO-MAUGÉRI, IM. Treatment with *Propionibacterium acnes* modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. **Immunol Lett**, v.88, pp.163–9, 2003.
- [17] KELLER, R; KEIST, R; JOLLER, PW. Macrophage response to bacteria and bacterial products: modulation on FC γ receptors and secretory and cellular activities. **Immunology**, v. 81, pp. 61-166, 1994.
- [18] TSUDA K, YAMANAKA K, LINAN W, MIYAHARA Y, AKEDA T, NAKANISHI T, KITAGAWA H, KAKEDA M, KUROKAWA I, SHIKU H, GABAZZA EC, MIZUTANI H. Intratumoral injection of *Propionibacterium acnes* suppresses malignant melanoma by Enhancing Th1 Immune Responses. **PLoS one**, v. 6, n. 12, 2011.
- [19] MEGID J, PERAÇOLLI MTS, CURI PR, ZANETTI CR, CABRERA WH, VASSAO R, ITO FH. Effect of vaccination and the immunomodulators "bacillus of Calmette- Guérin, Avridine and *Propionibacterium acnes* on rabies in mice. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, pp. 305-318, 1998.
- [20] NUSSENZWEIG, R. Increased nonspecific resistance to malaria produced by administration of killed *Corynebacterium parvum*. **Exp Parasitol**, v. 21, pp. 224-231, 1967.
- [21] BRENER Z, CARDOSO JE. Nonspecific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. **J Parasitol**, v. 62, pp. 645-646, 1976.

[23] HILL, JO. Modulation of the pattern of development of experimental disseminated Leishmaniasis by *Corynebacterium parvum*. **J Leukoc Biol**, v. 41, pp. 165-169, 1987.

[24] ISEKI H, TAKABATAKE N, OTA N, ISHIGAME T, YOKOYAMA N, IGARASHI I. Babesia: The protective effects of killed *Propionibacterium acnes* on the infections of two rodent Babesia parasites in mice. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, pp. 543-548, 2008.

[25] ABEL LCJ, CHEN S, RICCA LG, MARTINS MF, GARCIA M, ANANIAS RZ, MUSSALEM JS, SQUAIELLA CC, SHAW RJ, LONGO-MAUGÉRI IM. Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. **Parasite Immunology**, v. 31, pp. 604-612, 2009.

[26] HA, DKK; LAWTON, JWM; GARDNER, ID. The effect of in vitro modulation of macrophage activation on *Mycobacterium lepraemurinum* infection. **J Comp Pathol**, v. 96, pp. 565-573, 1986.

[27] SQUAIELLA, C.C., BRAGA, E.G., ANANIAS, R.Z., LONGHINI, A.L.F., MUSSALEM, J.S., SILVA, R.M., LONGO-MAUGERI, I.M., 2001. Effect of the mice treatment with *Propionibacterium acnes* on the specific response and activity of immune system cells on the *Klebsiella pneumoniae* infection. Anais do IX Congresso de Iniciação Científica – PIBIC, p. 7.

[28] HALPERN, BN; PRÉVOT, AR; BIOZZI, G; STIFFEL, C; MOUTON, D; MORARD, JC; BOUTHILLIER, Y; DECREUSEFOND, C. Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial provoquée par *Corynebacterium parvum*. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. I, pp. 77-96, 1963

- [29] MacDONALD, AS; STRAW, AD; DALTON, NM; PEARCE, EJ. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. **J immunol**, v. 168, pp. 537-540, 2002.
- [30] DAVIS, EG; RUSH, BR; BLECHA, F. Increases in cytokine and antimicrobial peptide gene expression in horses by immunomodulation with *Propionibacterium acnes*. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 4, n. 1, pp. 5-11, 2003.
- [31] ANANIAS RZ, RODRIGUES EG, BRAGA EG, SQUAIELLA CC, MUSSALEM JS, et al. Modulatory effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on peritoneal exudate cells from C57Bl/6 mice: major NKT cell recruitment and increased cytotoxicity. **Scandinavian journal of immunology**, v. 65: pp. 538–548, 2007.
- [32] KITAGAWA H, YAMANAKA K, KAKEDA M, INADA H, IMAI YASUTOMO, GABAZZA EC, KUROKAWA I, MIZUTANI H. *Propionibacterium acnes* vaccination induces regulatory T cells and Th1 immune responses and improves mouse atopic dermatitis. **Experimental dermatology**, v. 20, pp. 145-158, 2010.
- [33] SANTOS IB, JUNIOR ACP, MELO DA. *Corynebacterium parvum* as an auxiliary treatment for multibacillary leprosy. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 5, PP. 563-571, set./out. 2000.
- [34] BAKER, CC; CHAUDRY, IH; GAINES, HO; BAUE, AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine caecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, pp. 331-335, 1983.

- [35] RITTIRSCH, D; HUBER-LANG, MS; FLIERL, MA; WARD, PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, pp. 31-36, 2009.
- [36] SMITH SR, CALZETTA A, BANKOWSKI J, KENWORTHY-BOTT L, TERMINELLI C. Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 54, pp. 22-29, 1993.
- [37] IKEDA N, MUKAIDA N, KANENO S, FUJIOKA N, SU S, NARIUCHI H, UNOUR M, HARADA K, NAKANUMA Y, KOBAYASHI K. Prevention of endotoxin-induced acute lethality in *Propionibacterium acnes*-primed rabbits by an antibody to leukocyte integrin beta 2 with concomitant reduction of cytokine production. *Infect Immun*, v. 63, n. 12, pp. 4812-4817, 1995.
- [38] ECHTENACHER B, FREUDENBERG MA, JACK RS, MÄNNEL DN. Differences in Innate Defense Mechanisms in Endotoxemia and Polymicrobial Septic Peritonitis. *Infect Immun*, v. 69, n. 12, pp. 7271-7276, 2001
- [39] REMICK, DG; NEWCOMB, DE; BOLGOS, GL; CALL, DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: Lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 13, n. 2, pp. 110-116, 2000.
- [40] DEJAGER, L; PINHEIRO, I; DEJONCKHEERE, E; LIBERT C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, pp. 198-208, 2011
- [41] MERLIN T., GUMENSCHHEIMER M, GALANOS C, FREUDENBERG A. TNF- α hyper-responses to gram-negative and gram-positive bacteria in *Propionibacterium*

acnes-primed or *Salmonella typhimurium* infected mice. **J. Endotoxin Res**, v. 7, pp.157–163, 2001

[42] COLLINS FM, SCOTT MT. Effect of *Corynebacterium parvum* treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 9, n. 5, pp. 863-869, 1974.

[43]ALVAREZ S, MEDICINI M, VINTINI E, OLIVER G, RUIZ HOLGADO AP, PERDIGON. Effect of the oral administration of *Propionibacterium acidi-propionici* on IgA levels and on the prevention of enteric infection in mice, **Microbiol. Aliment. Nutr**, v.14, pp. 237–243, 1996.

[44] MOCHIZUKI H, NOMURA T, KAWAMURA I, MITSUYAMA. Enhanced resistance to gram-positive bacterium and increased susceptibility to bacterial endotoxin in mice sensitized with *Propionibacterium acnes*: involvement of Toll-like receptor. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, pp. 287-293, 2005.

[45] BENJAMIM, CF; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Role of oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infec. Dis**, v. 182, pp. 214-223, 2000.

[46] BENJAMIM, CF; SILVA JS; FORTES, ZB; OLIVEIRA, MA; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect. Immun.** V. 70, pp. 3602-3610, 2002.

[47] LEE, WEI-LI; SHALITA, AR; SUNTHARALINGAM, K; FIKRIG, SM. Neutrophil chemotaxis by *Propionibacterium acnes* lipase and its inhibition. **Infect. Immun.**, v. 35, pp. 71-78, 1982.

[48] VINSON, RB; CARROLL, JL; PRUETT, SB. Mechanism of suppressed neutrophil mobilization in a mouse model for binge drinking: role of glucocorticoids. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 275, pp. R1049-R1057, 1998.

[49] YONEYAMA, H; MATSUNO, K; ZHANG, Y; MURAI, M; ITAKURA, M; ISHIKAWA, S; HASEGAWA, G; NAITO, M; ASAKURA, H; MATSUSHIMA, K. et al. Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. **J Exp Med**, v. 193, pp. 35–49, 2001.

[50] ZHANG Y, YONEYAMA H, WANG Y, ISHIKAWA S, HASHIMOTO S, GAO JL, MURPHY P, MATSUSHIMA K. Mobilization of dendritic cell precursors into the circulation by administration of MIP 1- α in mice. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, pp. 201-209, 2004. (doi: 10.1093/jnci/djh024)

[51] TAVARES-MURTA, B.M., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The intravenous administration of tumor necrosis factor, interleukin 8 and macrophage- neutrophil derived chemotact factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production, **Br. J.Pharmacol.** v. 24, p. 1369, 1998.

[52] REDDY, ABM, SRIVASTAVA SK, RAMANA KV. Anti-inflammatory effect of aldose reductase inhibition in murine polymicrobial sepsis. **Cytokine**, v. 48, pp. 170-176, 2009.

[53] CUNHA, F. Q.Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **PNAS** .v.106 , n. 10, 2009

- [54] PANG Q, DOU L, PAN X, ZENG S, HE J, XU W, ZENG Y. Methylene chloride protects against cecal ligation and puncture-induced acute lung injury by modulating inflammatory mediators. **Int Immunopharm**, v. 10, pp. 929-932, 2010.
- [55] KIM MS, BAE GS, PARK KC, KOO BS, KIM BJ, LEE HJ, SEO SW, SHIN YK, JUNG WS, CHO JH, KIM YC, KIM TH, SONG HJ, PARK SJ. Myrrh inhibits LPS-induced inflammatory response and protects from cecal ligation and puncture-induced sepsis. **eCAM** pp. 1-11, 2012.
- [56] REIS VO, SILVA JC, SOUA GT, SEMEDO P, BUSCARIOLLO B, PEREIRA RL, CENEDEZE MA, PACHECO-SILVA A, LONGO-MAUGÉRI IM. The polysaccharide fraction of *Propionibacterium acnes* modulates the development of experimental focal segmental glomerulosclerosis. **Immunobiology**, 2012. doi:10.1016/j.imbio.2011.12.003
- [57] MATSUKAWA, A., HOGABOAM, C.M., LUKACS, N.W., LINCOLN, P.M., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. **J Immunol**. v, 163, pp. 6148-54, 1999.
- [58] SPEYER CL, GAO H, RANCILIO NJ, NEFF TA, HUFFNAGLE GB, SARMA JV, et al. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. **Am J Pathol** 2004;165:2187–96.
- [59] GOMES RN, FIGUEIREDO RT, BOZZA FA, PACHECO P, AMANCIO RT, LARANJEIRA AP, CASTRO-FARIA-NETO HC, BOZZA PT, BOZZA MT. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/CC chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced

macrophage migration inhibitory factor production. **Shock**, v. 26, n. 5, pp. 457-463, 2006.

[60] KÜMPERS P, GUELER F, DAVID S, SLYKE PV, DUMONT DJ, PARK J, BOCKMEYER CL, PARIKH SM, PAVENSTÄDT, HALLER H, SHUSHAKOVA. The synthetic Tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. **Crit Care**, v. 15:R261, 2011.

[61] ICHIYASU H, SUGA M, MATSUKAWA A, IYONAGA K, MIZOBE T, TAKAHASHI T, ANDO MASAYUKI. Functional roles of MCP-1 in *Propionibacterium acnes*-induced, T cell-mediated pulmonary granulomatosis in rabbits. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, pp.482-491, 1999.

[62] RAMNATH, RD, WEI NG, S, GUGLIELMOTTI, A, BHATIA, M. *Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis*. *Int Immunopharmacol*, v. 8, n. 6, pp. 810-818, 2008.

[63] HSING CH, CHOU W, WANG JJ, CHEN HW, YEH CH. Propofol increases bone morphogenetic protein-7 and decreases oxidative stress in sepsis-induced acute kidney injury. **Nephrol Dial Transplant.**, pp.1-11, 2010.

[64] DROTT J, ALEXEYEV O, BERGSTRÖM P, ELGH F, OLSSON J. *Propionibacterium acnes* infection induces upregulation of inflammatory genes and cytokine secretion in prostate epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 126. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/126>

[65] AKAZA N, AKAMATSU H, KISHI M, MIZUTANI H, ISHII I, NAKATA S, MATSUNAGA K. Effects of *Propionibacterium acnes* on various mRNA expression levels in normal human epidermal keratinocytes in vitro. **Journal of dermatology**, v. 36, pp. 213-223, 2009. doi: 10.1111/j.1346-8138.2009.00626.x

- [66] MEGID J, KANENO R, NOZAKI CN, BRITO CJC, ALMEIDA MF. Increased interleukin-10 associated with low IL-6 concentration correlated with greater survival rates in mice infected by rabies virus vaccinated against it and immunomodulated with *P. acnes*. **Comparative immunology, microbiology & infectious diseases**, v. 2004, pp. 393-411, 2004.
- [67] LEON, LR; WHITE, AA; KLUGER, MJ. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. **Am. J. Physiol**, v.275, pp. R269-R277, 1998.
- [68] RIEDEMANN, NC; GUO, RF; WARD, PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. **Nat. Med.** v.9, pp. 517–524, 2003.
- [69] MOORE, K.W., MALEFYT, R.W., COFFMAN, R.L., O’GARRA, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** v.19, p.683-765, 2001
- [70] SMITH SR, TERMINELLI C, DENHARDT G, NARULA S, THORBECKE J. Administration of Interleukin-10 at the time of priming protects *Corynebacterium parvum*-primed mice against LPS- and TNF- α -induced lethality.
- [71] HIRAKI S, ONO S, KINOSHITA M, TSUJIMOTO H, TAKAHATA R, MIYAZAKI H, SAITOH D, SEKI S, HASE K. Neutralization of IL-10 restores the downregulation of IL-18 receptor on natural killer cells and interferon- γ production in septic mice, thus leading to an improved survival. **Shock**, v. 37, n. 2, pp. 177-182, 2012.
- [72] KALECHMAN Y, GAFTER U, GAL R, RUSHKIN G, DONGHONG Y, ALBECK M, SREDI B. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. **J. Immunol**, v. 169, pp. 384-392, 2002.

[73] NEWSOME CT, FLORES E, AYALA A, GREGORY S, REICHNER JS. Improved antimicrobial host defense in mice following Poly-(1,6)- β -d-Glucopyranosyl-(1,3)- β -d-Glucopyranose glucan treatment by a gender-dependent immune mechanism. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, n. 12, pp. 2043-2049, 2011.

[74] HIRAKI S, ONO S, TSUJIMOTO H, KINOSHITA M, TAKAHATA R, MIYAZAKI H, SAITOH D, HASE K. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- β - decreases the percentages of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery*, v. 151, n. 2, pp. 313-322, 2012.

Figure1

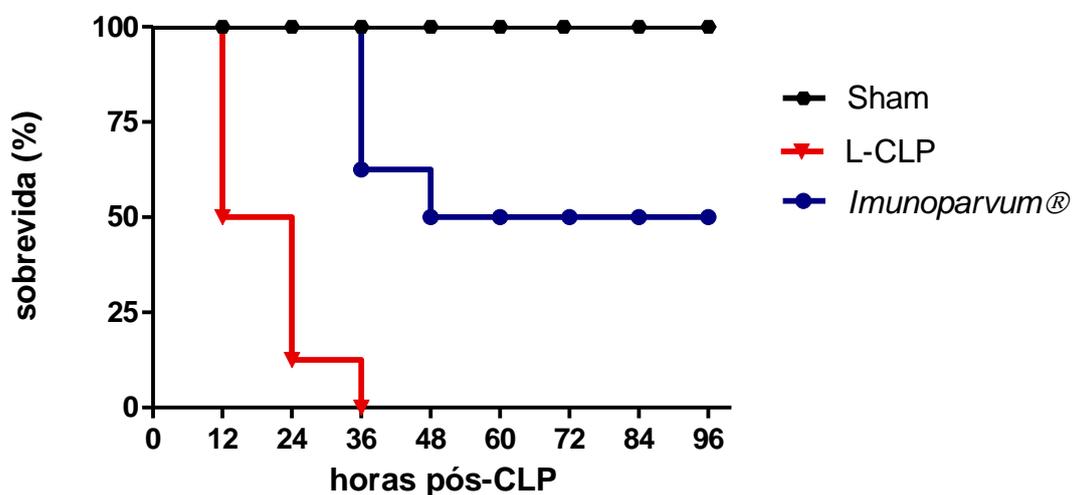
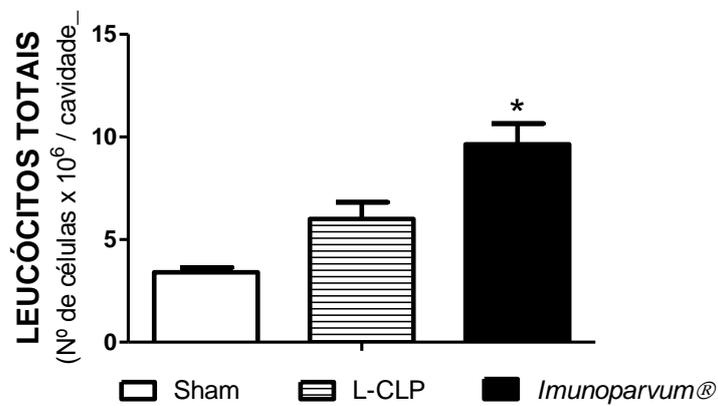


Fig 1. Effect of *P. acnes*-killed on survival rate of CLP rats (n=8). The data are expressed as the cumulative percentage of rats still alive within each interval and the survival each 6 h was recorded. Compared with CLP group, *P. acnes*-killed improved survival within 96 h. All animals survived in the sham group. $P < 0.05$ vs CLP group.

Figure 2

A



B

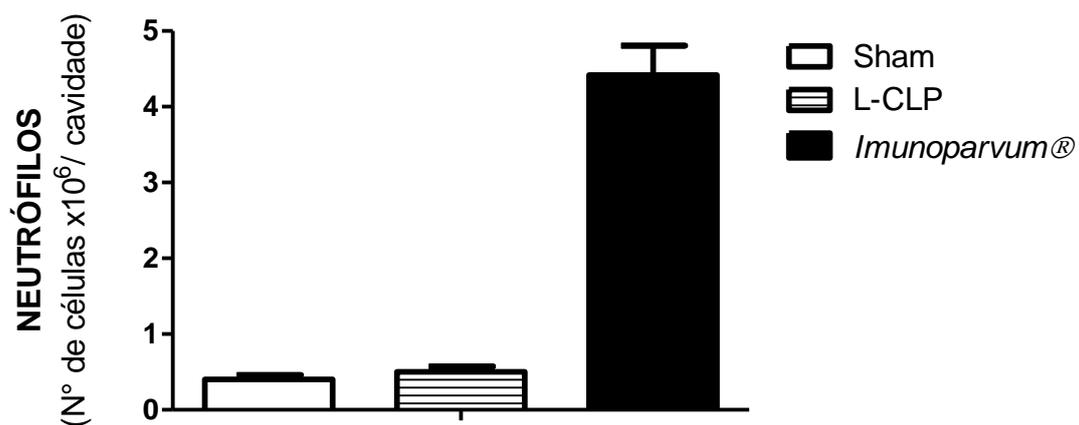


Fig 2. Total (A) and differential (B) cell counting in the peritoneal cavity. The total and differential counting of peritoneal cells were performed 6 h after the CLP (A). The results were expressed as mean \pm S.E.M (7 animals/group). * $p < 0.05$ when compared to the control group

Figure 3

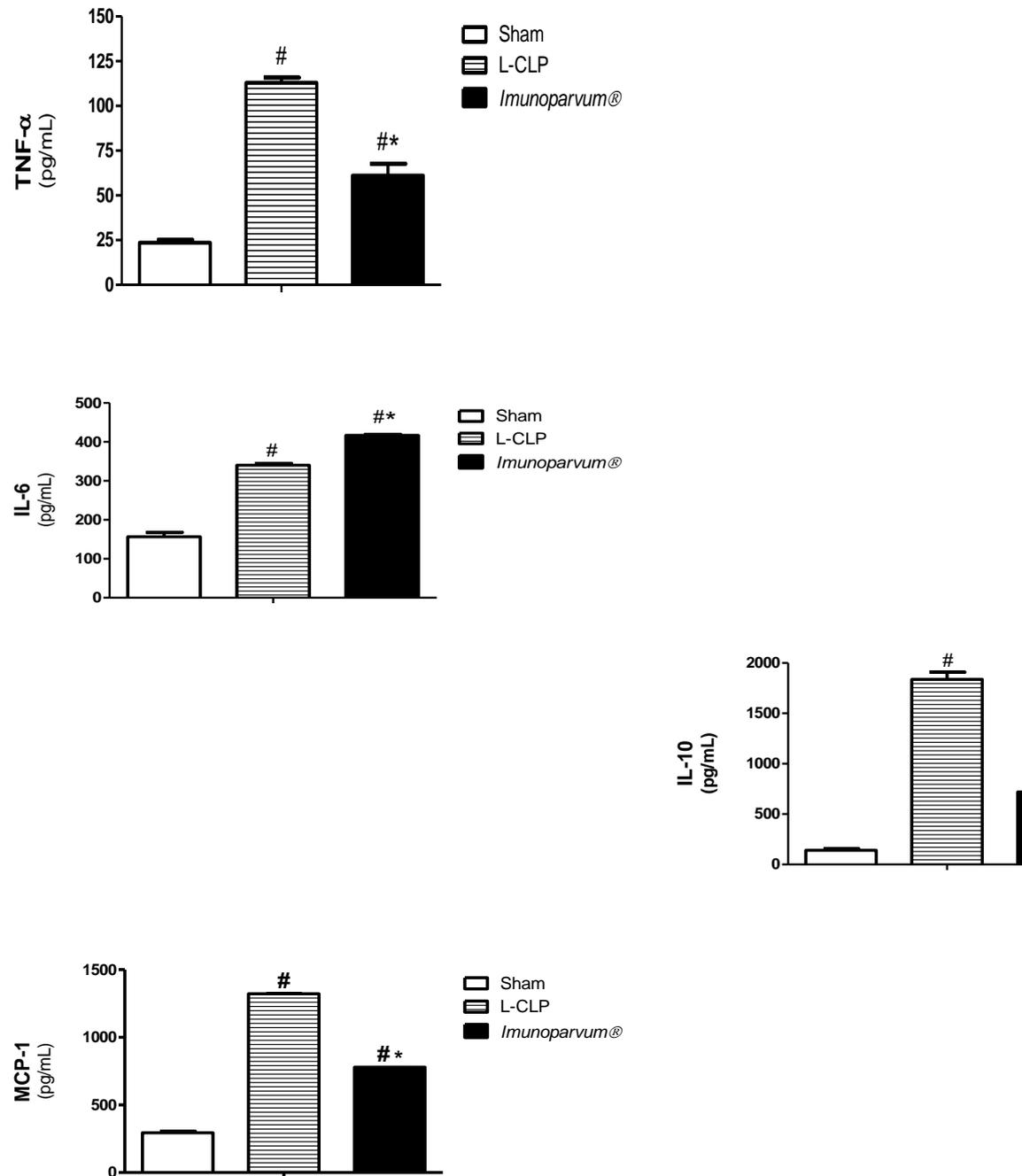


Fig 3. Effect of *P. acnes*-killed treatment in animals (n = 6) in the expression of TNF- α , IL-6, IL-10 and MCP-1 levels in the peritoneal cavity of mice subjected to CLP. The cytokine levels in peritoneal

exudates were determined at 6 h after surgery in sham-operated, L-CLP and *P. acnes* - killed mice. Results are expressed as means \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with L-CLP.

Figure 4

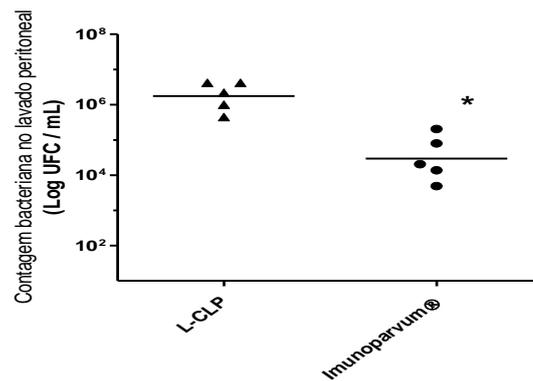


Figure 4 Bacterial counts in the peritoneal fluid of L-CLP and *P. acnes*-killed groups (n=5). Quantification of the amount of bacteria in the peritoneal cavity was performed 6 h CLP surgery. The number of bacteria present in the peritoneal cavity is expressed as mean LogCFU per mL. ** $P < 0.05$ compared with L-CLP..