



ALINE RISSETTI ROQUETTO

**EXPOSIÇÃO ALIMENTAR À PRÓPOLIS: RESPOSTA DE
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DA MICROBIOTA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM
DIETA OBESOGÊNICA**

CAMPINAS
2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ALINE RISSETTI ROQUETTO

**EXPOSIÇÃO ALIMENTAR À PRÓPOLIS: RESPOSTA DE
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DA MICROBIOTA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6 TRATADOS COM
DIETA OBESOGÊNICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição, na área de Concentração Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan

Co-orientador: Dra. Fernanda de Pace

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
ALINE RISSETTI ROQUETTO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JAIME AMAYA-FARFAN**

**CAMPINAS
2015**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

R688e Roquette, Aline Rissetti, 1990-
Exposição alimentar à própolis : resposta de biomarcadores inflamatórios e da microbiota intestinal em camundongos C57BL/6 tratados com dieta obesogênica / Aline Rissetti Roquette. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Jaime Amaya-Farfan.
Coorientador: Fernanda de Pace.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Microbiota intestinal. 2. Obesidade. 3. Inflamação. 4. Citocinas. 5. Propole. I. Amaya-Farfan, Jaime. II. Pace, Fernanda de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Dietary exposure to propolis : response of inflammatory biomarkers and intestinal microbiota in C57BL/6 mice fed a high-fat diet

Palavras-chave em inglês:

Gut microbiota

Obesity

Inflammation

Cytokines

Propolis

Área de concentração: Nutrição Experimental e de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Jaime Amaya-Farfan [Orientador]

Juliano Lemos Bicas

Lucia Del Carmen de La Hoz Urrejola

Data de defesa: 20-03-2015

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan
Presidente
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas

Dra. Lucia Del Carmen de La Hoz Urrejola
Membro Titular
Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo
Membro Suplente
Universidade Federal da Grande Dourados

Profa. Dra. Priscila Neder Morato
Membro Suplente
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

ABSTRACT

Obesity is a major world-wide public health problem and is associated with metabolic disorders as generalized inflammation, insulin resistance, dyslipidemia, hepatic steatosis, among others. Recently, it has been demonstrated that changes in the proportions of phyla that make up the gut microbiota have a profound effect on the metabolism and physiology of the host. The modern diet has been identified as one of the factors that modulate the intestinal bacteria and trigger inflammatory responses. Considering this state of affairs and knowing that propolis, a resin present in bee honey, has anti-inflammatory and anti-microbial action, the present study was designed to evaluate the effect of propolis supplementation on the intestinal microbiome and inflammatory biomarkers of mice pre-conditioned with a high-fat diet. Forty mice of the C57BL/6 strain were randomly divided into four groups (n = 10): control group – diet based on the AIN 93-G; high-fat group – diet with 37% fat; and two other groups treated with high-fat, HFP2 and HFP5, that were supplemented with 0.2% propolis during two and five weeks preceding sacrifice, respectively. Blood and muscle samples were collected for biochemical analyses and inflammation markers, the cecal contents were extracted for DNA sequencing of the intestinal microbiota's genome. The results showed no differences in weight gain among the experimental groups, but treatment with propolis for 5 weeks effectively reverted the dysbiosis caused by the HF diet with respect to the *Firmicutes* and *Proteobacteria* phyla. The levels of serum lipopolysaccharide (LPS), and Toll-like receptor-4 (TLR4) expression, and proinflammatory cytokines in muscle were reduced by the longer propolis treatment. In addition, this intervention improved serum glucose and serum triacylglycerol levels. The present results suggest that ingested propolis exerts its beneficial action, first modifying the intestinal microbiota, which limits intestinal wall permeability and controls the translocation of bacterial components into the bloodstream and thus averting inflammatory cytokine overexpression.

Keywords: gut microbiota, obesity, inflammation, cytokines, propolis

RESUMO

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo associada a diversas doenças metabólicas como inflamação, resistência insulínica, dislipidemia, esteatose hepática, entre outras. Recentemente, tem sido demonstrado que alterações nas proporções dos filos que compõem a microbiota intestinal repercutem negativamente sobre o metabolismo e processos fisiológicos do hospedeiro. A dieta moderna é apontada como um dos fatores capazes de modular as bactérias intestinais e desencadear respostas inflamatórias. Diante deste cenário e tendo conhecimento de que a própolis, resina produzida por abelhas que possui ação anti-inflamatória e antimicrobiana, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação da própolis em camundongos tratados com dieta hiperlipídica sobre a microbiota intestinal e biomarcadores inflamatórios. Quarenta camundongos da linhagem C57BL/6 foram divididos em 4 grupos (n=10) aleatoriamente: grupo controle – dieta baseada na AIN-93G; grupo hiperlipídico (HF) – dieta com 37% de gordura; e grupos HFP2 e HFP5 tratados com dieta hiperlipídica, seguida de suplementação com própolis 0,2% nas duas e cinco semanas que antecederam ao sacrifício respectivamente. Foram coletadas amostras de sangue e músculo para determinações bioquímicas e indicadores de inflamação, o conteúdo cecal foi extraído para sequenciamento do DNA da microbiota intestinal. Os resultados não mostraram diferenças no ganho de peso entre os grupos experimentais, mas o tratamento com própolis por 5 semanas foi efetivo em reverter a disbiose causada pela dieta HF, com relação aos filos *Firmicutes*, e *Proteobacteria*. Os níveis de lipopolissacarídeos (LPS) no soro, bem como a expressão de *toll-like receptor-4* (TLR4) e de citocinas pró-inflamatórias no músculo foram reduzidos pelo tratamento prolongado com própolis. Além disso, esta intervenção melhorou os níveis séricos de glicose e triacilgliceróis. Estes resultados sugerem a possibilidade de que a própolis exerça ação benéfica modificando o microbioma que limita a permeabilização da parede intestinal, regulando a translocação de componentes bacterianos para a corrente sanguínea e, conseqüentemente, conduzindo a uma menor expressão de citocinas inflamatórias.

Palavras-chave: microbiota intestinal, obesidade, inflamação, citocinas, própole.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Microbiota intestinal.....	7
2.1.1 Função metabólica.....	10
2.1.2 Função trófica.....	11
2.2 Microbiota intestinal e resposta inflamatória.....	13
2.3 Própolis.....	17
2.3.1 Extração e toxicidade.....	19
2.3.2 Atividade imunomoduladora.....	20
2.3.3 Efeito antiobesogênico.....	20
2.3.4 Atividade antimicrobiana.....	21
2.4 Efeito da dieta sobre a microbiota.....	22
2.5 Modelo experimental.....	23
3 REFERÊNCIAS.....	24
4 ARTIGO.....	33
5 CONCLUSÃO GERAL.....	57
6 ANEXOS.....	61

Dedico

Aos meus pais, João e Ana,
por todo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan, por ter aceitado me orientar, pela confiança e dedicação depositada neste trabalho, e principalmente por acreditar em minha capacidade.

À minha co-orientadora Fernanda de Pace, por toda a paciência e ensino que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad, pela colaboração e oportunidade de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Juliano Lemos Bicas, Dra. Lucia Del Carmen de La Hoz Urrejola, Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo e Dra. Priscila Neder Morato, por todas as sugestões.

À toda equipe do LICRI, em especial a Dioze e Andrey, que contribuíram muito para a realização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Yong kun Park, pelas amostras de própolis e pelo conhecimento compartilhado.

À Viviane Toreti, pela ajuda com as análises cromatográficas e pela grande amizade que se iniciou neste processo.

À Carla e Susana, por toda ajuda e conselhos.

Aos meus colegas de laboratório, Naice, Carol, Franz e Kelly, pela ajuda com as análises e principalmente pela amizade.

À Tássia, por todas as ótimas conversas de vida, valores e profissão. Obrigada por sempre me guiar pelo melhor caminho e me fazer acreditar que no final sempre há uma recompensa nos aguardando.

À Tais, pela amizade de longa data e por todos os momentos de risadas e descontração que abrandaram as dificuldades da pós-graduação.

À Karina, por ter se tornado a minha segunda família em Campinas. Obrigada pelo carinho e apoio.

Ao Daniel, pelo companheirismo e incentivo.

Ao CNPq e CAPES pela bolsa concedida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de fatores que levaram ao aumento da obesidade.....	8
Figura 2: Composição do LPS.....	14
Figura 3: Esquema representativo do processo inflamatório via TLR4. A passagem de LPS pela barreira intestinal é reconhecida por estruturas denominadas LBP (LPS binding protein) e CD14. A partir da identificação do LPS pelo TLR4, ocorre a sinalização de intermediários como Myd88, IRAK e TRAF-6. A ativação de TLR4 é concluída com a translocação de NFkB do citosol para o núcleo da células, estimulando a produção de citocinas inflamatórias em diversos órgãos alvo	16
Figura 4: Fórmulas estruturais de alguns compostos presentes na própolis.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS:

AGCC		Ácidos graxos de cadeia curta
DCNT		Doenças crônicas não transmissíveis
DE ₅₀		Dose eficaz
DL ₅₀		Dose letal
EEP	<i>Ethanolic extract of propolis</i>	Extrato etanólico de própolis
Fiaf	<i>Fasting-induced adipocyte factor</i>	Fator derivado de adipócito induzido por jejum
GPR	<i>G protein-coupled receptors</i>	Receptores acoplados às proteínas G
H ₂ O ₂	<i>Hydrogen peroxide</i>	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i>	Interferon-gama
IL-10	<i>Interleukin-10</i>	Interleucina-10
IL-13	<i>Interleukin-13</i>	Interleucina-13
IL-4	<i>Interleukin-4</i>	Interleucina-4
IL-6	<i>Interleukin-6</i>	Interleucina-6
IL-8	<i>Interleukin-8</i>	Interleucina-8
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>	Lipase lipoproteica
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>	Lipopolissacarídeos
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	Fator nuclear κB
NO	<i>Nitric oxide</i>	Óxido nítrico
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>	Receptores reconhecedores de padrão
PYY	<i>Peptide YY</i>	Peptídeo YY
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>	Receptor tool-like
TLR-4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>	Receptor 4 do tipo Toll

TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>	Fator de necrose tumoral- α
---------------	--	---------------------------------------

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

O trato gastrointestinal é um sistema especializado no processamento e fornecimento de nutrientes ao organismo que contribui para a regulação da saciedade (DUKA, SAKAR, COVASA, 2013). Desarranjos nesse sistema, como consequência da alta ingestão de lipídeos, contribuem para a manifestação de doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, resistência insulínica e dislipidemias. Evidências destacam o papel da dieta moderna e da microbiota intestinal sobre o surgimento de tais desordens metabólicas e a influência sobre processos fisiológicos do hospedeiro (DUKA, SAKAR, COVASA, 2013; BACKHED *et al.*, 2004).

Ao contrário do que se pensava até fins do Século XX, a microbiota bacteriana detém outras funções que vão muito além de metabolizar polissacarídeos não digeríveis para a produção de ácidos graxos de cadeia curta (CHASSARD, LACROIX, 2013). O desequilíbrio entre os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, a chamada disbiose, está associado à obesidade decorrente da obtenção e armazenamento de energia mais eficiente pelas bactérias. Em decorrência disso, este “órgão microbiano” acomodado no trato digestório tem repercussão sobre o sistema imunológico, na medida em que as bactérias podem ultrapassar a barreira intestinal e causar uma série de alterações metabólicas, incluindo a obesidade e a resposta insulínica.

A compreensão de que a diversidade de determinadas comunidades microbianas está ligada à obesidade merece ser melhor estudada, visando ao desenvolvimento de novas estratégias que auxiliem no tratamento das patologias a ela associadas (LEY *et al.*, 2005). A microbiota intestinal é altamente variável de acordo com as características do indivíduo, da dieta, além de hábitos tais como o uso de antibióticos e higiene. Esses fatores garantem uma combinação única de ecologia bacteriana para cada indivíduo (FRAZIER; DIBAISE; MCCLAIN, 2011). Dentre esses fatores, a dieta se destaca por constituir os substratos para a fermentação bacteriana (LOUIS *et al.*, 2007).

A dieta desempenha um importante papel sobre a saúde, sendo que muitos

alimentos exercem efeitos protetores e auxiliam no tratamento de doenças comuns. Dentre os produtos naturais conhecidos por exercerem efeitos funcionais podem-se destacar os produtos gerados pelas abelhas tais como: geléia real, mel e própolis (VIUDA-MARTOS, 2008). A própolis é um produto coletado e modificado pela *Apis mellifera*, bastante utilizado na medicina popular, que é composta de 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos ou essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (AL-WAILI *et al.* 2012; GHISALBERTI, 1979). Farmacologicamente, este produto não pode ser classificado nem como de origem vegetal, nem como animal.

A própolis é considerada um produto complexo, pois sua composição pode ser influenciada pelo clima e origem botânica (INOUE *et al.* 2008; DE CASTRO, 2001). A vegetação é a principal matéria-prima utilizada pela abelha para produzir a própolis. Assim, são reconhecidas 13 grupos de própolis, em função da extensa vegetação que o Brasil apresenta. Estão muito bem documentadas as propriedades biológicas que essa classe de substâncias possui, dentre as quais a ação anticancerígena (SAWICKA *et al.*, 2012; WATANABE *et al.*, 2011), anti-inflamatória (MACHADO *et al.*, 2012), antimicrobiana (AL-WAILI *et al.*, 2012), antifúngica (DE CASTRO *et al.*, 2013), imunomoduladora (ORSATTI *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2012), e antiangiogênica (DALEPRANE *et al.*, 2012) se destacam por terem mostrado elevada importância no meio científico. As aplicações dadas pela medicina popular à própolis têm provocado o interesse nas suas propriedades biológicas e o estímulo à investigação a fim de comprovar os seus efeitos benéficos à saúde e elucidar os mecanismos de ação.

Tendo em vista as complexas interações entre dieta, microbiota intestinal e hospedeiro, e as propriedades conhecidas da própolis na saúde, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da suplementação de própolis sobre a estrutura da microbiota intestinal e regulação de resposta inflamatória em camundongos.

REFERÊNCIAS

- AL-WAILI, N.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M.J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K. **Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans isolates in single and polymicrobial cultures.** International Journal of Medical Sciences, v.9, p.793-800, 2012.
- BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; GOU YOUNG KOH, G.Y.; ANDRAS NAGY, A.; CLAY F. SEMENKOVICH, C.F.; GORDON, J.I. **The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, p.15718-15723, 2004.
- CHASSARD, C.; LACROIX, C. **Carbohydrates and the human gut microbiota.** Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, v.16, p.453-460, 2013.
- DALEPRANE, J.B.; FREITAS, V.S.; PACHECO, A.; RUDNICK, M.; FAINE, L.A.; DORR, F.A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L.A.; ONG, T.P.; ABDALLA, D.S.P. **Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis.** Journal of Nutritional Biochemistry, v.23, p.557-566, 2012.
- DE CASTRO SL. **Propolis: biological and pharmacological activities.** Therapeutic uses of this bee-product. Annual Review of Biomedical Sciences, v.3, p.49-83, 2001.
- DE CASTRO, P.A.; BOM, V.L.; BROWN, N.A.; ALMEIDA, R.S.; RAMALHO, L.N.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M.H.; BERRETTA, A.A.; GOLDMAN, G.H. **Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in Candida albicans.** Fungal genetics and biology, 2013.
- DUCA, F. A.; SAKAR, Y.; COVASA, M. **The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity.** Journal of Nutritional Biochemistry, v. 24, p.1663 -1677, 2013.
- FRAZIER, T.H.; DIBASE, J.K.; MCCLAIN, C.J. **Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury.** Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, v.35, p.14-20, 2011.
- GHISALBERTI, E.L. **Propolis: a review.** Bee World, v.60, p.59-84, 1979.
- INOUE, K.; SAITO, M.; KANAI, T.; KAWATA, T.; SHIGEMATSU, N.; UNO, T.; ISOBE, K.; LIU, C.; ITO, HISAO. **Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line *In Vivo* and *In Vitro*.** The American Journal of Chinese Medicine, v.36, p.625-34, 2008.

LEY, R.E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R.D.; GORDON, J.I. **Obesity alters gut microbial ecology**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.102, p.11070-11075, 2005.

LOUIS, P.; SCOTT, K.P.; DUNCAN, S.H.; FILNT, H.J. **Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine**. Journal of Applied Microbiology, v.102, p.1197-1208, 2007

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

ORSATTI, C.L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A.C.; BACHIEGA, M.C.; BÚFALO, J.P.; ARAÚJO, JR.; SFORCIN, J.M. **Propolis immunomodulatory action In Vivo on Toll-Like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice**. Phytotherapy Research, v.24, p.1141-1146, 2010.

SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M.H.; NIKLIŃSKI, J. **The anticancer activity of propolis**. Folia Histochemica et Cytobiologica, v. 50, p.25-37, 2012.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. **Functional properties of honey, propolis, and royal jelly**. Journal of Food Science, v.73, p.117-124, 2008

WATANABE, M.A.; AMARANTE, M.K.; CONTI, B.J.; SFORCIN, J.M. **Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review**. The Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.63, 1378-1386, 2011.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microbiota intestinal

Segundo a organização mundial da saúde (OMS), a obesidade pode ser definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que apresenta risco para a saúde. Além de ser um dos maiores problemas globais encontrados na saúde pública atualmente, esta doença acarreta no surgimento de outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Em 2007 no Brasil, 72% das mortes foram atribuídas as DCNT, entre elas as doenças cardiovasculares, doenças crônicas respiratórias, diabetes, e outras (SCHMIDT *et al.*, 2011).

Apesar de ser um dos tópicos mais discutidos na área da saúde, a prevalência de indivíduos obesos é preocupante. No Brasil, o excesso de peso é de 50,8% da população sendo maior entre homens (54,7%) do que em mulheres (47,4%) (BRASIL, 2014). Dentre as causas que levaram a esta elevação do número de pessoas acima do peso está o crescimento econômico aliado à modernização e desenvolvimento das indústrias de alimentos (MCLAREN, 2007). Os humanos estão geneticamente condicionados a hábitos vivenciados pelos nossos ancestrais, com escolhas limitadas e alimentos minimamente processados (CORDAIN *et al.*, 2005). O choque ocasionado pela inserção de “novos alimentos” que apresentem alterações na composição de macro e micronutrientes originaram manifestações de doenças e aumento da mortalidade (CORDAIN *et al.*, 2005).

A obesidade é uma consequência natural do desbalanço energético e inatividade física. O aumento do consumo de gordura e açúcar, e a baixa ingestão de fibras e frutas são um dos retratos clássicos encontrado na dieta moderna (POPKIN, 2002). Essas mudanças nos padrões alimentares são decorrentes do maior poder aquisitivo da população, mudanças de estilo de vida e estresse (Figura 1) (MISRA, KHURANA, 2008). Dietas ricas em gorduras possuem maior densidade energética e são mais palatáveis, característica que faz com que sejam consumidas muitas vezes sem moderação e resultem em consequências adversas para a saúde (WILLET, 2002). Assim, estratégias que visem à redução e

prevenção da obesidade têm sido propostas para mudança deste cenário.

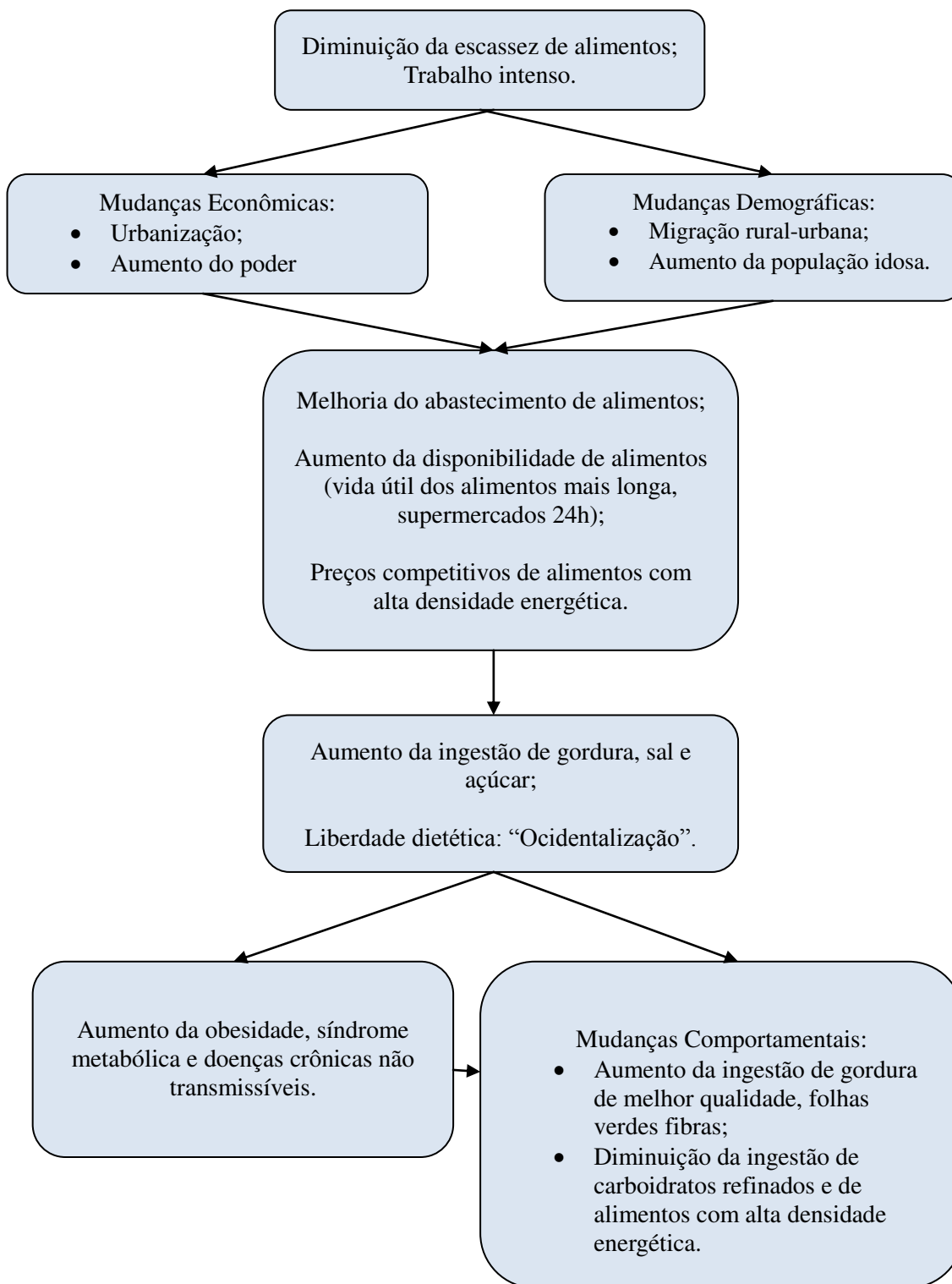


Figura 1: Esquema representativo de fatores que levaram ao aumento da obesidade. (Adaptado de MISRA, KHURANA, 2008).

A composição da dieta tem sido estudada como uma das causas para o desenvolvimento da obesidade, não apenas pela densidade energética dos alimentos, mas também pela capacidade de modulação da microbiota intestinal (MURPHY *et al.*, 2010). As bactérias presentes no intestino humano surgem como uma fonte adicional de aquisição energética eficiente, capaz de comprometer a homeostase e provocar resistência insulínica, inflamação, ganho de adiposidade e peso corporal (CARVALHO, SAAD, 2013).

O trato gastrointestinal é uma via comum de exposição a agentes exógenos, o que faz do intestino um dos primeiros órgãos a evidenciar a ação de microrganismos e agentes sinalizadores do sistema imune. A dieta hiperlipídica em especial, promove a ativação de mastócitos e *toll-like receptors* (TLRs) que estimulam a produção de citocinas inflamatórias a partir da ativação do NF-κB (LEE, 2013).

Nos primeiros anos de vida, a alimentação é o principal elemento que determina as colônias que irão ser formadas no intestino humano (KOVATCHEVA-DATCHARY, ARORA, 2013). O início da alimentação complementar pode influenciar no surgimento da obesidade e alteração da composição corporal. Isso é ocasionado pela atividade que as bactérias intestinais exercem sobre o metabolismo do hospedeiro, afetando o balanço energético (ADAIR, 2012). Assim, a composição da microbiota é influenciada por vários fatores, mas recentes evidências destacam o papel da dieta consumida, sugerindo que existe uma relação entre o consumo de dieta, estado obesogênico e microbiota intestinal (HILDEBRANDT *et al.*, 2009).

A literatura demonstra que animais antes de serem submetidos a uma dieta com alto teor lipídico possuem uma grande quantidade de comunidades microbianas do filo *Bacteroidetes* e após consumo de dieta experimental, há um predomínio do filo *Firmicutes* sobre a microbiota intestinal dos camundongos (HILDEBRANDT *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2010). Esses dois filos são os maiores representantes das bactérias presentes no trato gastrointestinal humano e de camundongos, sendo 60-80% de *Firmicutes* e 20-40% de *Bacteroidetes*, constituindo mais de 98% de todo RNAr 16S em mamíferos, em meio a mais de

10 trilhões de micro-organismos que habitam o intestino (LEY *et al.*, 2005; LEY, PETERSON, GORDON, 2006).

A detecção de comunidades microbianas que habitam o intestino humano é imprescindível para avaliar a influência sobre a saúde (WALKER *et al.*, 2011). A microbiota intestinal pode ser tratada como um órgão microbiano, capaz de consumir, armazenar e redistribuir energia. Assim, a relação entre a microbiota e o hospedeiro, frequentemente denominada de comensalismo, deve ser definida como “mutualismo”, pois há interação entre as duas espécies e ambas se beneficiam. O homem se beneficia com a digestão de polissacarídeos, e as bactérias se alojam em um ambiente propício para seu crescimento (BACKHED *et al.*, 2005).

Apesar de a composição microbiana estar em contínua transformação, determinadas bactérias são capazes liberar toxinas, ocasionar infecções (toxemias), ou doenças quando prevalecem sobre os demais micro-organismos. Mesmo com os potenciais maléficos que estes micro-organismos representam sobre o nosso organismo, a presença da microbiota intestinal é essencial para a vida por prover ao hospedeiro algumas funções (WALKER *et al.*, 2011; ALONSO, GUARNER, 2013):

2.1.1 Função metabólica:

Os humanos secretam amilases e glucoamilases que auxiliam na degradação do amido, embora polissacarídeos como: amido resistente, celulose, hemicelulose, pectina e alguns oligossacarídeos, não são digeridos pelo sistema gastrointestinal devido à ausência de enzimas capazes de vencer impedimentos estéricos ou de clivar ligações β -glicosídicas em polissacarídeos de vegetais. Assim, as bactérias que colonizam o trato gastrointestinal são incumbidas de realizar a digestão final através da fermentação (CHASSARD, LACROIX, 2013; FLINT *et al.*, 2012). A microbiota humana tem a capacidade de realizar fermentação, liberando substratos, que conferem energia adicional ao hospedeiro (GUARNER, MALAGELADA, 2003). Neste sentido, este sistema de captação de energia pode

comprometer o metabolismo e a saúde humana. A fermentação não é um simples processo que envolve a degradação de oligossacarídeos e polissacarídeos, pois os produtos gerados pela decomposição desses carboidratos agem mutuamente sobre a modulação da composição e atividade da microbiota do hospedeiro (CHASSARD, LACROIX, 2013).

As comunidades fibrolíticas são reconhecidas como os primeiros degradadores que liberam açúcares para utilização por outras bactérias que, apesar de serem glicolíticas, são incapazes de degradar certas fibras. Portanto, as comunidades microbianas estabelecem relação de cooperação em redes alimentares, onde o produto final da fermentação de um organismo pode servir de substrato para outro. Este fenômeno é conhecido como *cross-feeding* e permite que os metabólitos sejam utilizados até que um equilíbrio seja alcançado (CHASSARD, LACROIX, 2013; EL AIDY *et al.*, 2013). Na natureza, o *cross-feeding* e a competição são aspectos importantes da fisiologia microbiana. Os procariontes conseguem formar comunidades ecológicas complexas constituídas por múltiplas espécies (STROUS *et al.*, 2012), como é o caso das bifidobactérias, que são caracterizadas pela capacidade de degradar frutanos tipo inulina. Entretanto, achados recentes indicam que nem todas as espécies de bifidobactérias se beneficiam da mesma forma da presença de inulina (DE VUYST, LEROY, 2011). Isso se deve às variações fenotípicas das bactérias em relação à sua capacidade de degradação, o qual confere especificidade às bactérias frente ao substrato. A degradação, por sua vez, colabora com quantidades substanciais de frutose livre no ambiente extracelular, dessa forma resultando em uma competição aumentada pelos substratos facilmente metabolizáveis (DE VUYST, LEROY, 2011).

2.1.2 Função trófica:

A fermentação intestinal de carboidratos leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gases (CO_2 e H_2). Este processo afeta todo o ecossistema, por exemplo, diminuindo o pH na medida em que os ácidos são produzidos. O baixo pH pode ter impacto negativo no crescimento de enteropatógenos, mas

também pode inibir a absorção de metabólitos pelos colonócitos (CHASSARD, LACROIX, 2013; FLINT *et al.*, 2012). Apesar disso, os AGCC são responsáveis por desempenharem função trófica sobre o epitélio intestinal, promovendo crescimento e diferenciação das células do epitélio (GUARNER, MALAGELADA, 2003). O acetato é o principal ácido graxo produzido no intestino e é facilmente absorvido e transportado para o fígado, enquanto que, os níveis de propionato parecem estar relacionados com a inibição da síntese hepática de colesterol, e o butirato é o principal combustível para os colonócitos. Esses produtos derivados da fermentação são produzidos no cólon na proporção de 3:1:1 (HIJOVA, CHMELAROVA, 2007).

Os AGCC também exercem efeito sobre a produção de hormônios da saciedade. A ligação entre AGCC e GPRs (*G protein-coupled receptors*), por exemplo, estimula a produção do hormônio PYY (*peptide YY*) (HAMER *et al.*, 2012). Os GPRs estão expressos em células do adipócito, células do sistema enteroendócrino e células do sistema imunológico. A consequente expressão de PYY inibe a motilidade intestinal, aumentando o tempo e a eficiência de absorção de nutrientes e energia (SAMUEL *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que camundongos colonizados com microbiota de animais obesos apresentam um aumento no percentual de gordura corporal (TURNBAUGH *et al.*, 2006). Esse resultado pode ser explicado pela diminuição da motilidade intestinal que garante a permanência do bolo alimentar por mais tempo no intestino, permitindo maior captação de calorias pelo intestino.

Os AGCCs podem ser utilizados como fonte de energia para o hospedeiro, de modo que a microbiota intestinal possa prover uma fração energética, de em torno de 10% das necessidades energéticas humanas (MCNEIL, 1984). Essa captação de energia adicional resulta na produção e armazenamento de triacilgliceróis em adipócitos, regulado pelo aumento da expressão de LPL (*lipoprotein lipase*) no tecido adiposo. Desarranjos da microbiota intestinal causam inibição da FIAF (*fasting-induced adipocyte factor*) que, por sua vez, inibe a LPL. (MOREIRA *et al.*, 2012a; LEY *et al.*, 2005; BACKHED *et al.*, 2004).

2.2 Microbiota intestinal e resposta inflamatória

A capacidade que as bactérias intestinais possuem de interferir sobre a homeostase do hospedeiro não é afetada somente pela captação extra de energia. Produtos gerados pela ecologia bacteriana, tal como lipopolissacarídeos (LPSs), conseguem ultrapassar a barreira intestinal, ativando células do sistema imunológico e contribuindo com a elevação dos níveis de citocinas no hospedeiro. O trato gastrointestinal é de origem ectodérmica e uma das suas funções é agir como barreira física, controlando a exposição dos tecidos internos do hospedeiro a bactérias, protegendo-os contra o desenvolvimento de infecções (HOOPER, LITTMA, MACPHERSON, 2012).

A barreira intestinal possui uma área de cerca de 400m² e despende cerca de 40% da nossa energia (BISCHOFF *et al.*, 2014). Este órgão é especializado em atuar sobre os mecanismos absorptivos de nutrientes e impedir a passagem de componentes bacterianos para o sistema circulatório, os quais se tornam responsáveis por desencadear resposta inflamatória. As alterações na estrutura da microbiota, induzidas pela dieta ocasionam um desequilíbrio entre as redes metabólicas favorecendo o crescimento de bactérias com potencial patogênico e que contribuem para surgimento de doenças inflamatórias intestinais (MAYNARD *et al.*, 2012).

Em geral a estrutura do LPS é composta por moléculas anfifílicas, ou seja, constituído por um polissacarídeo hidrofílico e um lipídeo hidrofóbico, denominado lipídeo A, unidos por ligação covalente (Figura 2) (OSBORN *et al.*, 1964). Esses componentes da parede celular externa de bactérias gram-negativas possuem grande potencial imunoestimulador quando reconhecido por seus receptores. Apesar do efeito negativo, baixas doses de LPS são encontradas em animais saudáveis sugerindo que essas estruturas passem constantemente pela barreira intestinal com a finalidade de proporcionar resistência a determinadas infecções (HEINE, RIETSCHEL, ULMER, 2001). O principal determinante sobre efeitos benéficos e deletérios são as quantidades encontradas na circulação capazes de estimular mediadores inflamatórios (MOREIRA *et al.*, 2012b).

A presença de níveis elevados desses constituintes bacterianos tem sido

reportadas em diversas patologias como doenças hepáticas, aterosclerose e na exacerbação do processo inflamatório em doenças pulmonares (KNOBLOCH *et al.*, 2013; CECCARELLI, NOBILI, ALISI, 2014). Os LPSs conseguem atingir a circulação sanguínea através de duas formas: a partir da captação pelos quilomicrons ou por alterações na permeabilidade intestinal. No momento em que ocorre a ingestão de alimentos ricos em gordura o trato gastrointestinal promove a liberação de lipases, que se encarregam de hidrolisar o triacilglicerol em 2 monoacilglicerol e ácidos graxos. Os produtos gerados pela digestão se complexam com os sais biliares formando micelas que favorecem a passagem dos lipídeos para o lúmen intestinal. Após a captação dos monoglicerídeos e ácidos graxos ocorre novamente a síntese dos triglicerídeos, os quais são envolvidos por lipoproteínas originando os quilomicrons. Essas partículas de gordura conseguem atingir a corrente sanguínea e alcançar vários tecidos (MU, HOY, 2004). Durante a fase de formação dos quilomicrons pelos enterócitos, os LPS são internalizados pelas lipoproteínas, devido a presença do Lipídeo A (GHOSHAL *et al.*, 2009).

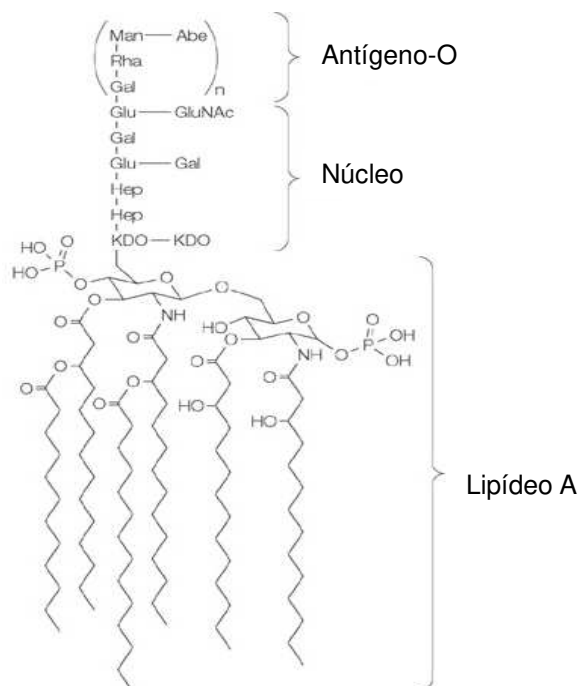


Figura 2: Composição do LPS (adaptado de MILLER, ERNST, BADER, 2005). Abe: Abequose; Man: Manose; Rha: Ramnose; Gal: Galactose; Glu: Glicose; GluNAc: N-acetilglicosamina; Hep: Heptose; KDO: cetodesoxioctonato.

A ingestão de dietas obesogênicas também pode aumentar a permeabilidade intestinal através da inibição da expressão de proteínas *tight-junction* presentes no epitélio (MOREIRA *et al.*, 2012b). Essas estruturas regulam a permeabilidade intestinal, limitando a passagem de agentes xenobióticos como micro-organismos, antígenos e toxinas, enquanto permite a adequada absorção de nutrientes e água (SUZUKI, 2013). O reconhecimento de irregularidades nas funções dessas proteínas no epitélio intestinal tem ajudado na identificação de doenças inflamatórias intestinais. Assim, falhas na regulação das *tight-junctions* conduzem ao aparecimento de um círculo infeccioso (GROSCHWITZ, HOGAN, 2009; ODENWALD, TURNER, 2013).

O sistema imune do intestino é estimulado pela exposição das bactérias aos tecidos do hospedeiro, havendo uma interação entre a imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata consegue distinguir os componentes microbianos patógenos de antígenos inofensivos através dos *pattern recognition receptors* (PRRs) e dos *toll-like receptors* (TLRs). Os receptores TLRs estão presentes em macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células do epitélio intestinal e outras células pertencentes ao sistema imune inato (PURCHIARONI *et al.*, 2013). Os TLRs são receptores que reconhecem estruturas únicas. No caso de LPS, os receptores TLR4 apresentam alta afinidade. O LPS é reconhecido e apresentado pelas proteínas LBP (*LPS binding protein*) e CD14 que apresentam ao complexo TLR4/MD-2 (PARK, LEE, 2013). A interação TLR4-LPS estimula mediadores como MyD88, IRAK e TRAF-6 que atuam sobre a translocação do NFkB do citosol para o núcleo celular tornando-o, assim, ativado. O NFkB ativado, por sua vez, aumenta a transcrição de citoninas pró-inflamatórias, tais como IL-4, IL-6, IL-13, IFN- γ e TNF- α (MILLER, ERNST, BADER, 2005). O consumo de dieta hiperlipídica parece ter efeito sobre a expressão de TLR4 devido ao aumento da translocação de LPS, condição que favorece o surgimento de um quadro inflamatório (KIM *et al.*, 2012). A figura 3 esquematiza a cascata inflamatória envolvendo a ativação de TLR4.

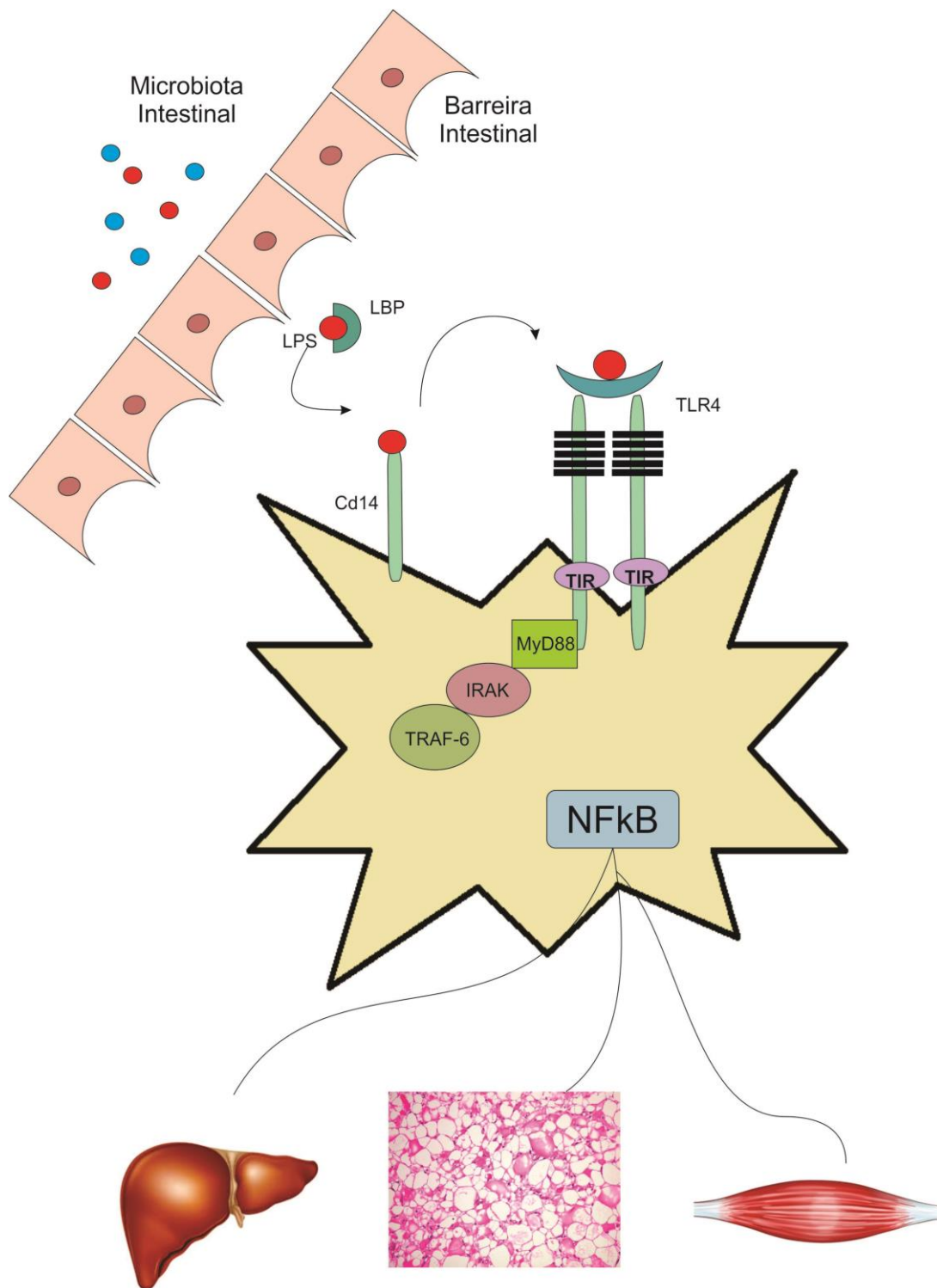


Figura 3: Esquema representativo do processo inflamatório via TLR4. A passagem de LPS pela barreira intestinal é reconhecida por estruturas denominadas LBP (LPS binding protein) e CD14. A partir da identificação do LPS pelo TLR4, ocorre a sinalização de intermediários como Myd88, IRAK e TRAF-6. A ativação de TLR4 é concluída com a translocação de NFκB do citosol para o núcleo da células, estimulando a produção de citocinas inflamatórias em diversos órgãos alvo (Adaptado de CECCARELLI, NOBILI, ALISI, 2014).

2.3 Própolis

Própolis é o nome genérico para uma substância resinosa complexa, elaborada a partir de produtos coletados de plantas e substâncias produzidas por abelhas (GHILSALBERTI, 1979). A palavra “própolis” é derivada do grego: “pro” – em defesa de, em prol de; e “polis” – cidade, assim, própolis significa em defesa da cidade, ou seja, defesa da comunidade da colmeia (SUZUKI, 2000). A própolis, além de proteger a colmeia contra possíveis invasores, está também destinada à função de evitar a contaminação e decomposição dos produtos da abelha e de selar os favos de mel e suavizar as paredes internas (BURDOCK, 1998).

A própolis é produzida a partir de exsudatos de plantas coletadas pelas abelhas *Apis mellifera*. A estas substâncias são acrescidas secreções salivares e ceras, conferindo a hidrólise dos flavonóides presentes na resina, sendo convertidos de glicosídeos em agliconas (BONVEHI, COLL, JORDÁ, 1994). Esse produto natural evidenciado desde os povos antigos que usufruíam dessa matéria para evitar a putrefação de cadáveres, ao longo da história, o uso da própolis se tornou tradicional e novas propriedades vêm sendo descobertas (PEREIRA, SEIXAS, NETO, 2002).

A própolis é considerada como um produto complexo que, farmacologicamente não pode ser classificado nem como produto vegetal, nem como produto de origem animal. Na atualidade, é utilizada pela medicina popular como medicamento para o tratamento de diversas doenças como infecções, úlceras, aterosclerose e inflamações. As atividades biológicas da própolis estão sujeitas às variações da composição química da matéria-prima utilizada pela abelha, que inclui mais de 300 constituintes (Anexo 1), cuja presença e proporção são influenciadas pelo local de origem (INOUE *et al.*, 2008; DE CASTRO, 2001).

Devido à grande diversificação de plantas utilizadas para a produção da própolis no mundo, são conhecidas diversas classes, tais como a própolis brasileira, européia, cubana e taiwanense, as quais possuem diferentes efeitos biológicos por possuírem diferentes características oriundas da flora de cada região (BANKOVA, 2005). Assim, o conhecimento da origem botânica da própolis

é importante para que a amostra tenha efetiva aplicação terapêutica (PARK *et al.*, 2002). No Brasil, a própolis foi inicialmente classificada em 12 grupos, de acordo com suas características físico-químicas: cinco grupos do sul, seis grupos do nordeste, e um do sudeste e centro-oeste brasileiro (PARK, ALENCAR, AGUIAR, 2002). Posteriormente, foi identificada a própolis vermelha nas áreas ribeirinhas de rios do Nordeste brasileiro, e produzida a partir de exudatos da *Dalbergia ecastophyllum*. Este produto foi classificado como Grupo 13 (DAUGSCH *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos de destaque na própolis são os flavonóides, aos quais se atribuem os principais efeitos terapêuticos (CASTALDO, CAPASSO, 2002; TORETI *et al.*, 2013). A Figura 4 ilustra a estrutura de alguns compostos presentes na própolis. Entretanto, como os efeitos terapêuticos estão relacionados à composição química da própolis, é reconhecido que a flora regional, época da colheita e espécie da abelha interferem sobre a complexa composição final da resina. Sendo assim, um dos grandes desafios para o Brasil é a grande diversidade da flora, que dificulta a padronização da própolis direcionada ao mercado. Para comercialização, a própolis precisa de uma padronização química que garanta qualidade, segurança e eficiência frente ao efeito esperado (BANKOVA, 2005).

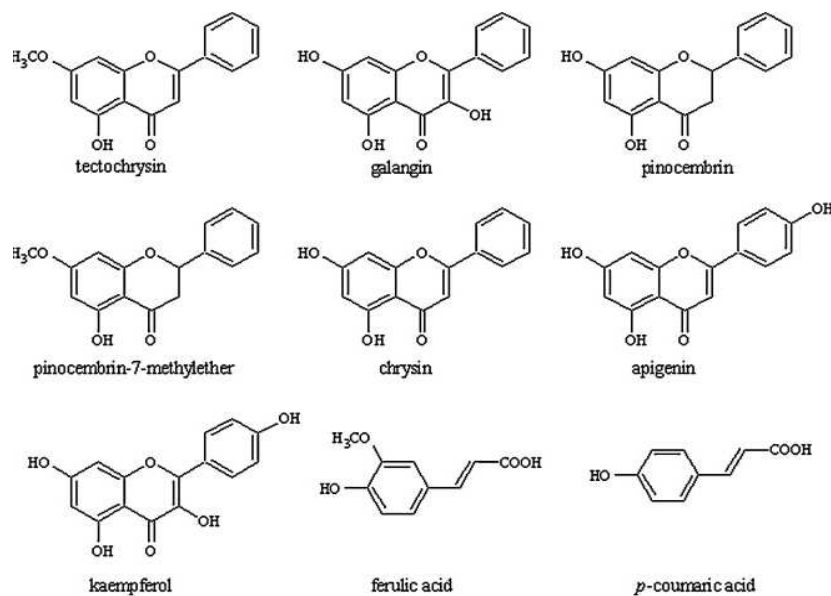


Figura 4: Fórmulas estruturais de alguns compostos presentes na própolis (BARBARIĆ *et al.*, 2011).

2.3.1 Extração e toxicidade:

Os flavonoides apresentam toxicidade relativamente baixa, porém esta pode ser afetada pelo método de extração empregado (BURDOCK, 1998). Reis *et al.* (2000) utilizaram extrato etanólico de própolis (EEP) para determinar a dose eficaz (DE₅₀) necessária para inibir o processo inflamatório em ratos. Este estudo constatou que o valor de DE₅₀ foi de 650mg/kg. Também foi determinada a dose letal (DL₅₀) utilizando camundongos que receberam diferentes concentrações de EEP, cujo valor foi de 3000 mg/kg. E para avaliação da toxicidade subcrônica foram utilizados ratos que receberam uma dosagem de 650 mg/kg durante 30 dias. O tratamento não apresentou alterações na mucosa gástrica e parâmetros hematológicos, não apresentando efeitos tóxicos que possam comprometer a utilização deste extrato.

Vários efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos presentes na própolis. Em trabalho desenvolvido por Park *et al.* (1998), verificou-se a concentração de flavonoides em EEP e comparou-se com o extrato aquoso. Além disso, foram avaliadas as atividades antimicrobiana e antioxidante em função da concentração de etanol utilizada. Foi demonstrado que a extração aquosa não forneceu extrato com atividade antimicrobiana. Observou-se também que a concentração de flavonoides entre os extratos etanólicos está intimamente relacionada com a intensidade de sua atividade biológica, sendo que os extratos etanólicos entre 60 e 80% inibiram satisfatoriamente o crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus*.

A constituição da própolis é decorrente da diversidade botânica da mesma, mas, a extração em diferentes solventes como etanol, metanol e água, e a padronização do processo, podem interferir na composição química e consequentemente no efeito biológico (ROCHA *et al.*, 2013; SFORCIN, BANKOVA, 2011).

2.3.2 Atividade imunomoduladora:

Em decorrência do uso de produtos naturais pela medicina popular, a própolis tem atraído grande interesse em pesquisas para o uso terapêutico. Trabalhos sugerem que a própolis desempenha uma importante atividade de regulação do sistema imunológico e pode ser utilizada no tratamento de algumas doenças infecciosas. Orsi *et al.* (2000) avaliaram o efeito da solução de própolis hidroalcóolica na ativação de macrófagos através da determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO). Os resultados apontaram um aumento na geração de H_2O_2 , relacionado à atividade microbica de macrófagos. *Baccharis dracunculifolia*, principal origem botânica da própolis verde brasileira, também apresenta maior liberação de H_2O_2 pelos macrófagos (MISSIMA *et al.*, 2007).

A própolis também exerce efeito sobre a expressão de TLR. Em um estudo dirigido por Orsatti *et al.* (2010) demonstrou-se um aumento da expressão de TLR-2 e de TLR-4 em camundongos tratados com 200mg/kg de extrato de própolis etanólico durante 3 dias consecutivos.

2.3.3 Efeito antiobesogênico:

Para tentar esclarecer o mecanismo anti-obesogênico da própolis, Koyamiyata *et al.* (2009) utilizaram própolis extraída em meio etanólico em camundongos alimentados com dieta *high-fat* contendo 50% de gordura durante 10 dias. O trabalho demonstrou que a administração de 50 mg de própolis, por kg de peso, reduziu o ganho de peso, quantidade de tecido adiposo peritoneal e níveis sanguíneos de colesterol e triacilgliceróis. No mesmo estudo, camundongos fêmeas foram alimentadas com dieta hiperlipídica comercial por 8 semanas, sendo um dos grupos tratado com 25mg/kg de extrato de própolis 2 vezes ao dia durante 4 semanas. Foi demonstrado que a administração da própolis reduziu significativamente o ganho de peso nos animais a partir do 7º dia, apresentando redução da gordura retroperitoneal e dos níveis de triacilgliceróis hepáticos e glicose.

Ichii *et al.* (2009), também submeteram ratos Wistar a uma dieta *high-fat* com 20% de banha, sendo um dos grupos suplementados com 0,5% de própolis na dieta. Após a suplementação por 8 semanas não foram encontradas diferenças significativas no peso corporal entre os grupos. Entretanto, o peso dos tecidos adiposos brancos (mesentérico, peritoneal e epididimal) do grupo suplementado foi significativamente menor do que no grupo controle. Houve ainda, redução dos níveis de colesterol e de triacilgliceróis séricos e hepáticos.

2.3.4 Atividade antimicrobiana:

O interesse sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana tem atraído à atenção devido ao aumento da resistência bacteriana aos produtos tradicionais (KAČÁNIOVÁ *et al.*, 2012). Preparações de extrato de própolis mostram atividade inibidora de crescimento bacteriano, viral e fúngico (CASTALDO, CAPASSO, 2002). Em um estudo que examinou a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis da Arábia Saudita e do Egito sobre as culturas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* em meios de culturas, individual e polimicrobiana, demonstrou-se inibição do crescimento de todos os patógenos utilizados. O estudo ainda apontou o sinergismo entre a própolis e a utilização de mel, potencializando o efeito antimicrobiano dos produtos elaborados pelas abelhas, e não sendo atribuído o efeito à presença do álcool etílico utilizado na produção de amostras da própolis (AL-WAILI *et al.*, 2012).

Outros trabalhos já comprovaram a ação antimicrobiana da própolis, e tem sido sugerido que a combinação da própolis com outros antibióticos pode potencializar a sua ação sobre a inibição do crescimento de bactérias. Sua atividade parece ter como alvo as membranas das bactérias, causando danos estruturais e funcionais aos patógenos. (SCAZZOCCHIOA *et al.*, 2006; MIRZOEVA, GRISHANIN, CALDER, 1997).

2.4 Efeito da dieta sobre a microbiota:

Vários fatores comprometem o equilíbrio das taxas populacionais dos filos que compõem a microbiota intestinal, dentre os quais se destacam as características do hospedeiro (idade, gênero, fatores genéticos) e fatores ambientais (stress, drogas, agentes tóxicos, infecção e doenças) (MOREIRA *et al.*, 2012b).

O trato gastrointestinal possui um complexo ecossistema que interage com o ambiente externo. Como mencionado anteriormente, a microbiota provê atividades indispensáveis ao hospedeiro, sem as quais ocorreriam efeitos negativos sobre a fisiologia humana. Hábitos alimentares praticados de maneira desequilibrada, como consumir gorduras saturadas, originam compostos que são conhecidos por ter efeitos tóxicos à saúde (DE WOUTERS, DORÉ, LEPAGE, 2012).

Os compostos originados pelo metabolismo acarretam em um processo de adaptação das bactérias frente aos substratos produzidos. Este processo serve como mecanismo de sobrevivência (SCOTT *et al.*, 2013). Os polifenóis são fitoquímicos presentes em ampla gama de produtos vegetais e apresentam efeito protetor implicando em diversos benefícios para a saúde intestinal. Estes compostos são absorvidos pelo trato gastrointestinal, mas uma grande fração persiste até o cólon, onde são extensivamente degradados pela microbiota intestinal, liberando metabólitos que contribuem para remodelação das comunidades microbianas (KEMPERMAN *et al.*, 2010; RASTMANESH, 2011). Os flavonóides geralmente são encontrados nas formas glicosiladas, assim a flora intestinal hidrolisa glicosídeos em agliconas, para posterior absorção (MANACH *et al.*, 2004). Entretanto, os *Firmicutes* apresentam redução no número de enzimas degradadoras de glicanos (MAHOWALD *et al.*, 2009), conferindo vantagem no crescimento de *Bacteroidetes*. Esta é uma das principais hipóteses para o efeito modulador dos polifenóis (RASTMANESH, 2011).

2.5 Modelo experimental:

Roedores têm sido usados para o desenvolvimento de obesidade porque, além de implicarem em um baixo custo para os ensaios, estes animais possuem o genoma sequenciado e podem ser alterados por intermédio da engenharia genética (SPURLOCK, GABLER, 2008). Adicionalmente, camundongos representam um bom modelo para estudos envolvendo a microbiota intestinal, por apresentarem semelhanças com o intestino humano em relação à sua composição (filos) (SPOR, KOREN, LEY, 2011).

Krych *et al.* (2013), relatam que a utilização de camundongos para tais estudos também depende das semelhanças do perfil da flora microbiana entre os gêneros e espécies de roedores com os humanos, embora as bactérias que colonizam o trato gastrointestinal humano sofram diferente influência do ambiente em comparação às bactérias de animais confinados em laboratórios. O próprio animal possui bactérias características em sua pele, além do mais, hábitos como coprofagia influenciam as comunidades microbianas. Entretanto, ter conhecimento de que os animais estão sujeitas a mudanças no microbioma e de suas implicações, permite que os modelos que utilizam roedores sejam utilizados para desvendar os mecanismos entre hospedeiro e microbiota. (KOSTIC, HOWITT, GARRETT, 2013).

Camundongos C57BL / 6, homozigotos com uma mutação no gene da leptina (ob/ob), desenvolvem um estereotipo de obesidade, podendo demonstrar a relação das comunidades microbianas com o aumento do balanço energético e peso corporal (LEY *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que dietas ricas em gorduras e carboidratos resultam em mudanças na constituição do microbioma. Deste modo, o destaque do papel da microbiota intestinal na regulação da homeostase energética em estudos com camundongos tem mostrado que a dieta exerce efeito de modulação da composição da flora independentemente do genótipo do animal (MURPHY *et al.*, 2010; TURNBAUGH *et al.*, 2008).

REFERÊNCIAS

ADAIR, L.S.; **How could complementary feeding patterns affect the susceptibility to NCD later in life?**. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, v.22, p.765-769, 2012.

AL-WAILI, N.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M.J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K. **Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures**. International Journal of Medical Sciences, v.9, p.793-800, 2012.

ALONSO, V.R.; GUARNER, F. **Linking the gut microbiota to human health**. British Journal of Nutrition, v.109, p.21-26, 2013.

BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; GOU YOUNG KOH, G.Y.; ANDRAS NAGY, A.; CLAY F. SEMENKOVICH, C.F.; GORDON, J.I. **The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, p.15718-15723, 2004.

BACKHED, F.; LEY, R.E.; SONNENBURG, J.L.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. **Host-bacterial mutualism in the human intestine**. Science, v.307, p.1915-1920, 2005.

BANKOVA, V. **Recent trends and important developments in propolis research**. Evidence-based complementary and alternative medicine, v.2, p 29-32, 2005.

BARBARIĆ, M.; MIŠKOVIĆ, K.; BOJIĆ, M.; LONČAR, M.B.; SMOLČIĆ-BUBALO, A.; DEBELJAK, Ž.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M. **Chemical composition of the etanolic propolis extracts and its effect on Hela cells**. Journal of Ethnopharmacology, v.135, p.772-778, 2011.

BISCHOFF, S.C.; BARBARA, G.; BUURMAN, W.; OCKHUIZEN, T.; SCHULZKE, J.; SERINO, M.; TILG, H.; WATSON, A.; WELLS, J.M. **Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy**. BMC Gastroenterology, v.14, p.1-25, 2014.

BONVEHÍ, J.B.; COLL, F.V.; JORDÁ, R.E. **The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.71, p.529-532, 1994.

BRASIL. **Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BURDOCK, G.A. **Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis)**. Food and Chemical Toxicology, v.36, p.347-363, 1998.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. **Propolis, an old remedy used in modern medicine**. Fitoterapia, p. S1-S6, v. 73, 2002.

CARVALHO, B.M.; SAAD, M.J.A. **Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance**. Mediators of Inflammation, v.2013, 2013.

CECCARELLI, S.; NOBILI, V.; ALISI, A. **Toll-like receptor-mediated signaling cascade as a regulator of the inflammation network during alcoholic liver disease**. World Journal of Gastroenterology, v.28, p.16443-16451, 2014.

CHASSARD, C.; LACROIX, C. **Carbohydrates and the human gut microbiota**. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.,v.16, p.453-460, 2013.

CORDAIN, L.; EATON, S.B.; SEBASTIAN, A.; MANN, N.; LINDEBERG, S.; WATKINS, B.A.; O'KEEFE, J.H.; BRAND-MILLER, J. **Origins and evolution of the western diet: health implications for the 21st century**. The American Journal of Clinical Nutrition, v.81, p.341-354, 2005.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PACHECO, E., LIMA, I.B., ABREU, J.A.; PARK, Y.K. **Própolis vermelha e sua origem botânica**. Mensagem Doce, v.89, 2006.

DE CASTRO SL. **Propolis: biological and pharmacological activities**. Therapeutic uses of this bee-product. Annual Review of Biomedical Sciences, v.3, p.49-83, 2001.

DE VUYST, L.; LEROY, F. **Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production**. International Journal of Food Microbiology, v.149, p.73-80, 2011.

DE WOUTERS, T.; DORÉ, J.; LEPAGE, P. **Does our food (environment) change our gut microbiome ('in-vironment')? A potential role for inflammatory bowel disease?** Digestive Diseases, v.30, p.33-39, 2012.

EL AIDY, S.; ABBEELE, P.V.D.; DE WIELE, T.V.; LOUIS, P.; KLEEREBEZEM, M. **Intestinal colonization: How key microbial players become established in this dynamic process: Microbial metabolic activities and the interplay between the host and microbes**. Bioessays, v.35, 2013.

FLINT, H.J.; SCOTT, K.P.; DUNCAN, S.H.; LOUIS, P. FORANO, E. **Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut**. Gut Microbes, v.3, p.289-306, 2012.

- GHISALBERTI, E.L. **Propolis: a review**. Bee World, v.60, p59–84, 1979.
- GHOSHAL, S.; WITTA, J.; ZHONG, J.; DE VILLIERS, W.; ECKHARDT, E. **Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides**. Journal of Lipid Research, v.50, p. 90-97, 2009.
- GROSCHWITZ, K.R.; HOGAN, S.P. **Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis**. Clinical reviews in allergy and immunology, v.124, p.3-20, 2009.
- GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. **Gut flora in health and disease**. Lancet, v. 361, p.512-519, 2003.
- HAMER, H.M.; DE PRETER, V.; WINDEY, K.; VERBEKE, K. **Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health?**. Gastrointestinal and Liver Physiology, v.302, 2012.
- HEINE, H.; RIETSCHER, E.T.; ULMER, A.J. **The biology of endotoxin**. Molecular Biotechnology, v.19, p.279-296, 2001.
- HIJOVA, E.; CHMELAROVA, A. **Short chain fatty acids and colonic health**. Bratislavské Lekárske List, v.108, p.354-358, 2007.
- HILDEBRANDT, M.A.; HOFFMANN, C.; SHERRILL-MIX, S.A.; KEILBAUGH, S.A.; HAMADY, M.; CHEN, Y.; KNIGHT, R.; AHIMA, R.S.; BUSHMAN, F.; WU, G.D. **High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity**. Gastroenterology, v.137, p.1716-1724, 2009.
- HOOPER, L.V.; LITTMAN, D.R.; MACPHERSON, A.J. **Interactions Between the Microbiota and the Immune System**. Science, v.336, p.1268-1273, 2012.
- ICHI, I.; HORI, H.; TAKASHIMA, Y.; ADACHI, N.; KATAOKA, R.; OKIHARA, K.; HASHIMOTO, K.; KOJO, S. **The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet**. Journal of Food Science, v.74, p.127-131, 2009.
- INOUE, K.; SAITO, M.; KANAI, T.; KAWATA, T.; SHIGEMATSU, N.; UNO, T.; ISOBE, K.; LIU, C.; ITO, HISAO. **Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line *In Vivo* and *In Vitro***. The American Journal of Chinese Medicine, v.36, p.625-34, 2008.
- KAČÁNIOVÁ M, ROVNÁ K, ARPÁŠOVÁ H, CUBOŇ J, HLEBA L, POCHOP J, KUNOVÁ S, HAŠČÍK P. **In vitro and in vivo antimicrobial activity of propolis on the microbiota from gastrointestinal tract of chickens**. Journal of Environmental Science and Health, Part A, v.47, p.1665-1671, 2012.

KEMPERMAN, R.A.; BOLCA, S.; L. C. ROGER AND, L.C.; VAUGHAN, E.E. **Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities**. Microbiology, v.156, p.3224-3231,2010.

KIM, K-A.; GU, W.; LEE, I-A.; JOH, E-H.; KIM, D-H. **High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via TLR4 signaling pathway**. Plos One, v. 7, 2012.

KNOBLOCH, J.; FELDMANN, M.; WAHL, C.; JUNGEN, B.; STOELBEN, E.; KOCH, A. **Endothelin receptor antagonists attenuate the inflammatory response of human pulmonary vascular smooth muscle cells to bacterial endotoxin**. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.346, p.290-299, 2013.

KOSTIC, A.D.; HOWITT, M.R.; GARRETT, W.S. **Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans**. Genes&Development, v.27, p.701-718, 2013.

KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; ARORA, T., **Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome**. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, v.27, p.59-72, 2013.

KOYA-MIYATA, S.; ARAI, N.; MIZOTE, A.; TANIGUCHI, Y.; USHIO, S.; IWAKI, K.; FUKUDA, S. **Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice**. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.32, p.2022-2028, 2009.

KRYCH, L.; HANSEN, C.H.F.; HANSEN, A.K.; BERG, F.W.J.V.D.; NIELSEN,D.S. **Quantitatively different, yet qualitatively alike: A meta-analysis of the mouse core gut microbiome with a view towards the human gut microbiome**. Plos One, v.8, 2013.

LEE, C.Y. **The effect of high-fat-induced pathophysiological changes in the gut on obesity: What should be the ideal treatment?**. Clinical and Translational Gastroenterology, v.4, 2013.

LEY, R.E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R.D.; GORDON, J.I. **Obesity alters gut microbial ecology**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.102, p.11070-11075, 2005.

LEY, R.E.; PETERSON, D.A.; GORDON, J.I. **Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine**. Cell, v.124, p.837-848, 2006.

MAHOWALD, M.A.; REY, F.E.; SEEDORFA, H.; TURNBAUGH, P.J.; FULTON, R.S.; WOLLAM, A.; SHAH, N.; WANG, C.; MAGRINI, V.; , WILSON, R.K.; CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; CROCK, L.W.; RUSSELL, A.; VERBERKMOES, N.C.; HETTICH, R.L.; GORDON, J.I. **Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.106, p. 5859- 5864, 2009.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMÉNEZ, L. **Polyphenols: food sources and bioavailability**. The American Journal of Clinical Nutrition, v.79, p. 727-747, 2004.

MAYNARD, C.L.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. **Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system**. Nature, v.489, p.231-241, 2012.

MCLAREN, L. **Socioeconomic Status and Obesity**. Epidemiologic Reviews, v.29, p.29-48, 2007.

MCNEIL, N.I. **The contribution of the large intestine to energy supplies in man**. The American Journal of Clinical Nutrition, v.39, p.338-342, 1984.

MILLER, S.I.; ERNST, R.K.; BADER, M.W. **LPS, TLR4 and infectious disease diversity**. Nature Reviews Microbiology, v.3, p.36-46, 2005.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. **Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria**. Microbiological Research, v.152, p.239-246, 1997.

MISRA, A.; KHURANA, L. **Obesity and the metabolic syndrome in developing countries**. The Journal of Clinical endocrinology and metabolism, v.93, p.S9-S30, 2008.

MISSIMA, F.; DA SILVA FILHO, A.A.; NUNES, G.A.; BUENO, P.C.; DE SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; SFORCIN, J.M. **Effect of Baccharis dracunculifolia D.C.(Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation**. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.59,p.463-468, 2007.

MOREIRA, A.P.B.; TEIXEIRA, T.F.S.; FERREIRA, A.B.; PELUZIO, M.C.G.; ALFENAS, R.C.G. **Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia**. British Journal of Nutrition, v.108, p.801-809, 2012a.

MOREIRA, A.P.B.; TEIXEIRA, T.F.S.; PELUZIO, M.C.G.; ALFENAS, R.C.G. **Gut microbiota and the development of obesity.** Nutrición Hospitalaria, v.27, p.1408-1414, 2012b.

MU, H.; HOY, C. **The digestion of dietary triacylglycerols.** Progress in Lipid Research, v.43, p.105-133, 2004.

MURPHY, E.F.; COTTER, P.D.; HEALY, S.; MARQUES, T.M.; O'SULLIVAN, O.; FOUHY, F.; CLARKE, S.F.; O'TOOLE, P.W.; QUIGLEY, E.M.; STANTON, C.; ROSS, P.R.; O'DOHERTY, R.M.; SHANAHAN, F. **Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models.** Gut, v.59, p.1635-1642, 2010.

ODENWALD, M.A.; TURNER, J.R. **Intestinal permeability defects: is it time to treat?** Clinical Gastroenterology and Hepatology, v.11, p.1075-1083, 2013.

ORSATTI, C.L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A.C.; BACHIEGA, M.C.; BÚFALO, J.P.; ARAÚJO, JR.; SFORCIN, J.M. **Propolis immunomodulatory action In Vivo on Toll-Like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice.** Phytotherapy Research, v.24, p.1141-1146, 2010.

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. **Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation.** Journal of Venomous Animals and Toxins, v.6, n.2, 2000.

OSBORN, M.J.; ROSEN, S.M.; ROTHFIELD, F.; ZELENICK, L.D.; HORECKER, B.L. **Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall.** Science, v.145, p.783-789, 1964.

PARK, B.S.; LEE, J.O. **Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes.** Experimental e Molecular Medicine, v.45: e66.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. **Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, p.2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. **Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal.** Ciência Rural, Santa Maria, v.32, p.997-1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.18, n.3, 1998.

PEREIRA, A.D.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.D. **A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** Química Nova, v. 25, p. 321-326, 2002.

POPKIN, B.M. **The shift in stages of the nutrition transition in the developing world differs from the past experiences!** Public Health Nutrition, v.5, p.205-214, 2002.

PURCHIARONI, F.; TORTORA, A.; GABRIELLI, M.; BERTUCCI, F.; GIGANTE, G.; IANIRO, G.; OJETTI, V.; SCARPELLINI, E.; GASBARRINI, A. **The role of intestinal microbiota and the immune system.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v.17, p.323-333, 2013.

RASTMANESH, R. **High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction.** Chemico-Biological Interactions, v.189, p.1-8, 2011.

REIS, C.M.F.; CARVALHO, J.C.T.; CAPUTO, L.R.G.; PATRÍCIO, K.C.M.; BARBOSA, M.V.J.; CHIEFF, A.L.; BASTOS, J.K. **Atividade anti-inflamatória, anti-úlceras gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.9-10, p. 43-52, 2000.

ROCHA, B.A.; BUENO, P.C.P.; VAZ, M.M.O.L.L.; NASCIMENTO, A.P.; FERREIRA, N.U.; MORENO, G.P.; RODRIGUES, M.R.; COSTA-MACHADO, A.R.M.; BARIZON, E.A.; CAMPOS, J.C.L.; DE OLIVEIRA, P.F.; ACÉSIO, N.O.; MARTINS, S.P.L.; TAVARES, D.C.; BERRETTA, A.A. **Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and In Vitro and In Vivo Efficacy and Safety Characterisation.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2013, 2013.

SAMUEL, B. S.; SHAITO, A.; MOTOIKE, T.; REY, F.E.; BACKHED, F.; MANCHESTER, J.K.; HAMMER, R.E.; WILLIAMS, S.C.; CROWLEY, J.; YANAGISAWA, M.; GORDON, J.I. **Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, p. 16767- 16772, 2008.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F.D.; ALESSANDRINIA, D.; PANTANELLA, F. **Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis.** Microbiological Research, v.161 p.327-333, 2006.

SCOTT, K.P.; GRATZ, S.W.; SHERIDAN, P.O.; FLINT, H.J.; DUNCAN, S.H. **The influence of diet on the gut microbiota.** Pharmacological Research, v.69, p.52-60, 2013.

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; AZEVEDO E SILVA, G.; MENEZES, A.M.; MONTEIRO, C.A.; BARRETO, S.M.; CHOR, D.; MENEZES, P.R. **Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges.** Lancet, v.377, p.1949-1961, 2011.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. **Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?**. Journal of Ethnopharmacology, v.133, p.253-260, 2011.

SPOR, A.; KOREN, O.; LEY, R. **Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome**. Nature Reviews Microbiology, v.9, p.279-290, 2011.

SPURLOCK, M.E.; GABLER, N.K. **The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome**. The Journal of Nutrition, v.138, p. 397-402, 2008.

STROUS, M.; KRAFT, B.; BISDORF, R.; TEGETMEYER, H.E. **The binning of metagenomic contigs for microbial physiology of mixed cultures**. Frontiers in microbiology, v.3, 2012.

SUZUKI, I.; **A própolis de solução aquosa**. Mensagem doce, nº 58, 2000.

SUZUKI, T. **Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions**. Cellular and Molecular Life Sciences, v.70, p.631-659, 2013.

TORETI, V.C.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. **Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin**. Evidence-based complementary and alternative medicine, v.2013, 2013.

TURNBAUGH, P.J.; BÄCKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J.I. **Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the Mouse Distal gut microbiome**. Cell Host & Microbe, v.3, p. 213-223, 2008.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. **An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest**. Nature, v.444, p.1027-1031, 2006.

WALKER, A.W.; INCE, J.; DUNCAN, S.H.; WEBSTER, L.M.; HOLTROP, G.; ZE, X.; BROWN, D.; STARES, M.D.; SCOTT, P.; BERGERAT, A.; LOUIS, P.; MCINTOSH, F.; JOHNSTONE, A.M.; LOBLEY, G.E.; JULIAN PARKHILL, J.; FLINT, H.J. **Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota**. International Society for Microbial Ecology, v.5, p.220-230, 2011.

WALKER, P.; CRANE, E. **Constituents of Propolis**. Apidologize, v. 18, p.327-334, 1987.

WHO- World Health Organization. **Healthy topics. Obesity**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 27/04/2013.

WILLET, W.C. **Dietary fat plays a major role in obesity: no**. obesity reviews, v.3, p.59-68, 2002.

ARTIGO

4 ARTIGO

Brazilian green propolis prevents dysbiosis, TLR4 overexpression and metabolic endotoxemia in mice fed high-fat diet

Aline Rissetti Roquette¹

Naice Eleidiane Santana Monteiro¹

Carolina Soares Moura¹

Viviane Cristina Toreti²

Fernanda de Pace³

Andrey dos Santos³

Yong Kun Park²

Jaime Amaya-Farfan¹

¹ Food and Nutrition Department, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

² Food Science Department, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

³ Internal Medicine Department, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author:

Name: Jaime Amaya-Farfan (jaf@fea.unicamp.br)

Telephone +55 19 35214075 / Fax +55 19 3521 4067

Address: Food and Nutrition Department, Faculty of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, 80, Monteiro Lobato Street, Campinas, 13083-862, SP, Brazil.

Running title: propolis, dysbiosis and endotoxemia

Abstract

Objective: Due to the various beneficial effects attributed to bee-honey propolis, which include anti-inflammatory and anti-bacterial infection properties, the objective of the study was to evaluate the effect of propolis supplementation on the structure of the intestinal microbiota and its anti-inflammatory action.

Methods: C57BL/6 male mice were fed a standard diet (control), high-fat (HF) diet, or a high-fat supplemented with 0.2% crude propolis (HFP) diet, with the supplemented groups for 2 or 5 weeks before sacrifice. Blood samples were collected for analysis of lipopolysaccharide (LPS) and biochemical parameters determination. Expression of biomarkers of the TLR4 pathway in muscle, and sequencing of the gut microbiota were performed.

Results: The HF diet effectively increased the proportion of phylum *Firmicutes* and inflammatory biomarkers, whereas supplementation of the HF diet with propolis remediated the structure of the intestinal microbiota, reduced levels of circulating LPS and consequently down-regulated the TLR4 pathway in muscle. Additionally, propolis improved biochemical parameters such as serum triacylglycerols and glucose.

Conclusion: Supplementing a high-fat diet with propolis produced substantial anti-inflammatory response in C57BL/6 mice restoring a nearly normal microbiota profile, thereby contributing to lower concentrations of circulating LPS and reducing overexpression of muscle TLR4 proteins.

Keywords: gut microbiota, cytokines, propolis, intestinal permeability, inflammation, obesity.

Introduction

Obesity is a major and expanding world-wide public health problem (Finucane *et al.*, 2011). The etiology of obesity is multifactorial and is characterized by excessive accumulation of body fat and low-grade inflammation.

Recently, some studies have reported on the relationship between the structure of the intestinal tract and metabolic characteristics of the host as a factor associated with health status, including inflammation and adiposity (Backhed *et al.*, 2004; Velagapudi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). Although the mechanisms involved in these changes have not been yet fully elucidated, it is recognized that increased concentrations of bacterial lipopolysaccharide debris (LPS) plays an important role in the movement of the inflammatory response in obesity (Cani *et al.*, 2007).

This condition, known as metabolic endotoxemia, is characterized by elevated levels of metabolic toxins in the bloodstream, aided by transmission through the chylomicrons, and the natural permeability of the intestinal barrier (Moreira *et al.*, 2012). This microbial debris has high affinity for the toll-like receptor-4 (TLR4), which is expressed on various cells of the innate immune system (Purchiaroni *et al.*, 2013). Recognition and binding of the LPS by the TLR4 stimulates the translocation of necrotizing factor NF- κ B to the nucleus, with the consequent production of proinflammatory cytokines (Cani, Delzenne, 2009).

Diet plays a critical role on the mechanisms involved in the inflammatory process. Eating habits with high levels of fat can modulate the structure of the intestinal microbiota, influence intestinal permeability and promote the transport of LPS via lipid metabolism (Moreira *et al.*, 2012). The substrates delivered by the diet will affect the microbiota structure by selectively feeding different microbes thus promoting potentially deleterious effects such as the inflammatory process and the development of diseases such as type-2 diabetes and metabolic syndrome.

Propolis is a complex resin produced by *Apis mellifera* widely used not as food, but as a folk medicine because of its different functional properties, which include: antimicrobial (Al-Waili *et al.*, 2012), anti-inflammatory (Machado *et al.*,

2012) and antioxidant (Nakamura *et al.*, 2012) effects. Use of Brazilian green propolis has been gaining adepts and awakening the interest among scientists mainly because of its anti-bacterial infection property.

Thus, because of the potential beneficial effects recognized in propolis and the profoundly negative metabolic overtones that inflammation can cause in the human body, the present work was designed to verify if the ingestion of propolis by C57BL/6 mice that had been previously treated with a high-fat diet could revert the expected adverse alterations in the TLR4 pathway, concentration of LPS in the blood and gut microbiota.

Materials and Methods

Materials

Antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): TLR4 (Ref. sc30002 diluted 1:1000), CD14 (Ref. sc9150 diluted 1:1000), MD-2 (Ref. sc20668 diluted 1:1000), MyD88 (Ref. sc11356 diluted 1:1000), IRAK-1 (Ref. sc7883 diluted 1:1000), TRAF-6 (Ref. sc7221 diluted 1:1000), TNF- α (Ref. sc8301 diluted 1:1000), IL-6 (Ref. sc1265 diluted 1:1000), IL-8 (Ref. sc7922 diluted 1:1000), IL-10 (Ref. ab 9969 diluted 1:1000); Abcam (Cambridge, MA): NF- κ B - p65 (Abcam Ref. 7979 diluted 1:1000), Lipase (Abcam Ref. ab109251 diluted 1:2000); Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA): α -tubulin (Ref. 2144).

Extraction of Propolis

The propolis was collected in the state of Minas Gerais, Brazil. The ethanol extract of propolis (EEP) was prepared as described by Park *et al.* (1998).

Chromatographic characterization of propolis

Analysis of EEP by RP-HPLC was performed according to the method described by Park, Alencar, Aguiar (2002). The standards used were: 4-coumaric acid, rutin, quercetin, Kaempferol, apigenin, pinocembrin, chrysin, galangin,

kaempferide, artemillin C, baccarin, drupanin, ferulic acid, acacetin, and isosakuranetin (Extrasynthese Co. - France).

Animals and diets

Forty C57BL/6 male mice aged 21-23 days were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation of the University of Campinas. The animals remained in individual cages (22 ± 1 °C, 60-70% humidity, 12 hours light/dark cycle) for adaptation with free access to water and commercial chow (Nuvital, Brazil) for 1 week. The experiment was approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA/UNICAMP, protocol nº 3015-1A). After adaptation, animals were randomized into four groups (n = 10 per group): lean control, high-fat (HF), high-fat + 2 weeks propolis (HFP2), high-fat + 5 weeks propolis (HFP5). The diets followed the basic AIN-93G nutrient composition (Reeves, Nielsen, Fahey, 1993), except that the high fat diets contained 37% lard. Groups HFP2 and HFP5 received the HF treatment for 7 weeks, followed by supplementation with 0.2% crude propolis (w/w) for either 2 or 5 weeks till sacrifice. The composition of diets is presented in Table 1. The weight gain was monitored weekly and the food intake every 2 days. The animals were anesthetized via an intramuscular injection with xylazine (10mg/kg) and ketamine (150mg/kg) immediately following sacrifice, adipose tissues were removed and weighed. Muscle and cecum fecal samples were dissected and stored at -80°C until analyses.

Table 1. Composition of the diets (g/kg diet)

Ingredients	Control ¹	High-Fat ²	HFP ^{2,3}
Starch	434.28	152.28	150.28
Casein	163.20	163.2	163.2
Dextrinized starch	132	132	132
Sucrose	100	100	100
Oil (corn)	70	40	40
Lard	0	312	312
Fiber	50	50	50
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
L-Cystine	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
<i>t</i> -butyl hydroquinone	0.014	0.014	0.014
Propolis	0	0	2
Total	1000	1000	1000

¹Control diet was AIN 93-G. ²Diets HF and HFP contained 37% lard added at the expense of starch.

³The HFP diet had 0.2% crude propolis added.

Blood Analysis

Blood samples were collected through portal vein puncture using a syringe and centrifuged 3000 x g (15 min; 4 °C) to obtain the serum. Serum parameters were determined using commercially available diagnostic kits: cholesterol, high density lipoprotein (HDL), triacylglycerols (TG), uric acid, glucose and total protein were purchased from Laborclin (Vargem Grande, PR, Brazil), and albumin from Labtest (Lagoa Santa, MG, Brazil). Serum lipopolysaccharide (LPS) was determined using a commercial kit based on a *Limulus amoebocyte* extract (LAL kit endpoint – QCL1000, Lonza, Switzerland). Blood samples were diluted to 20% (vol./vol.) with endotoxin-free water and then heated to 70°C for 10 min as described by Carvalho *et al.*, (2012).

Western Blot

Muscle tissue samples were homogenized in the extracting buffer. The extracts were subjected to SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes, blocked with 5% skim milk and incubated overnight with specific primary antibodies. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (Supersignal West Pico chemiluminescent substrate, Thermo Fisher Scientific).

The bands were visualized using a UVITEC Cambridge instrument (model Alliance LD2) and blots were quantified using UN-SCAN-IT software.

Sequencing the intestinal microbiota

Total DNA was extracted from the cecal contents with the QIAmp DNA Stool Kit. The library construction and sequencing were performed using the same procedure described for VLP, but without using the GenomiPhi.

For each sample, the 16S rRNA gene was amplified using the direct amplifier corresponding to the following sequence: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**ACTCCTACGGGAGGCAGCA**G-3'. In this sequence, the portion in italics corresponds to the adapter Nextera® transposase sequences A, and the sequence in bold is the initiator widely conserved 338F. The reverse initiator used was 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**TTACCGCGGCTGCTGGCA**C-3', the portion in italics corresponding to the adapter Nextera® transposase sequences B and the sequence in bold is the initiator of ample utilization **533R**.

For the preparation of the libraries, the kit "Illumina Truseq DNA Sample Preparation v2" was used, labeling each sample with a bar code. Sequencing was performed on an equipment Illumina Hiseq2000 at the Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD-Unicamp, Campinas, Brazil).

Phylotyping characterization and taxonomy - The identity of sequences was calculated using the megablast technique. The taxonomy was filed seeking the best megablast against GreenGenes. To determine the best BLAST, sequences derived from bacterial VLPs in custom databases were built with the help of GreenGenes database.

Clustering of the sample by UniFrac - A sequence representing each phylotype was aligned using NAST in order to construct a phylogenetic tree by means of a FastTree system with Kimura correction. The samples were clustered using the UniFrac metric (Lozupone *et al.*, 2005). For phylogenetic reconstructions, representative phylotype sequences were aligned using NAST (de Santis *et al.*,

2006).

Statistical Analysis

All data were presented as means and SEM and analyzed by ANOVA, followed by the Duncan post-hoc test using the statistical package for social sciences (SPSS, Chicago, IL, USA) software, version 17.0 for windows. The level for significance was set to $p < 0.05$. The graphic were made in GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Characterization of Ethanolic Extract of Green Propolis

The phenolic compound profile of the ethanol extract of propolis (EEP) was evaluated by RP-HPLC. The chromatograms revealed that EEP contained coumaric acid, pinobanksin, kaempferol, pinocembrin, pinobanksin-3-acetate, crisin, galangin, artepillin C and baccarin (Figure 1). Other minor compounds with slightly shifted retention times from known standards were left without identification.

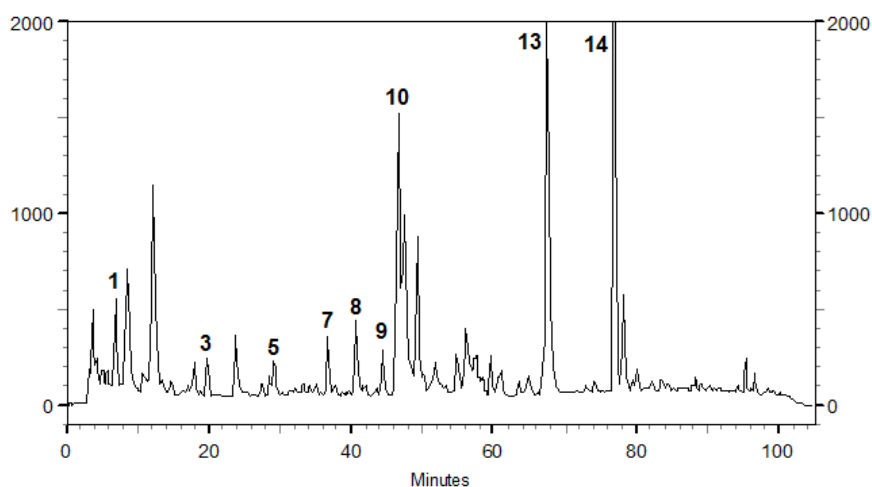


Figure 1. HPLC chromatogram of EEP. (1) coumaric acid; (3) pinobanksin; (5) kaempferol; (7) pinocembrin; (8) pinobanksin-3-acetate; (9) crisin, (10) galangin; (13) Artepillin C; (14) baccarin.

Body composition

High-fat diet consumption prompted the experimental animals to reduce food intake compared to the control. There was no difference in consumption between the groups that received the HF and the HFP diets. The total consumption of propolis by the HFP2 and HFP5 groups were: 92.76 ± 4.39 and 226.02 ± 8.00 mg respectively. No differences were detected either in body weight, Lee index or epididymal fat among the experimental groups (Table 2). The spleen weight was found decreased only in the control group.

Table 2. Body composition, body weight and food intake of mice, at the end of 8 experimental weeks

Parameter	Control	High-fat	HFP2	HFP5
Body weight ¹ (g)	27.81 ± 1.04	27.06 ± 0.84	26.85 ± 0.93	27.76 ± 0.96
Food intake ¹ (g)	198.16 ± 5.14 ^a	137.58 ± 2.38 ^b	135.89 ± 2.19 ^b	136.65 ± 1,05 ^b
Lee Index ² (g/cm ³)	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.03
Epididymal adipose tissue ² (mg/g)	15.53 ± 1.37	14.66 ± 1.79	12.40 ± 1.44	15.31 ± 2.06
Spleen weigh ² (mg/g)	2.74 ± 0.15 ^b	4.01 ± 0.38 ^a	3.45 ± 0.32 ^{ab}	3.95 ± 0.26 ^a

¹ Final body composition and cumulative food intake of mice treated with high-fat diet supplemented with 0.2% propolis. ² Mean values of epididymal adipose tissue, spleen and Lee index of animals treated with different experimental diet. Data are expressed as means ± SEM. Different superscript letters indicate statistical difference.

Biochemical Parameters

The high-fat diet had the effect of raising classical non-health parameters, such as blood glucose, triacylglycerols, cholesterol, uric acid, as well as serum proteins. Both treatments with propolis (HFP2 and HFP5) decreased blood glucose and triacylglycerol (TG) levels (Figures 2A,2B) back to normal, but prompted increases of about 40% in total cholesterol with no appreciable influence on HDL-cholesterol (Figures 2C,2D). It was interesting to note, however, that while the 2-week treatment with propolis (HFP2) had no effect on the elevated levels of serum uric acid, total protein and albumin, prolonging the propolis treatment for five weeks (HFP5) brought about a reduction in all three parameters to levels no different from those of the control (Figures 2E,2F,2G, respectively). Finally, levels of LPS were considerable increased by the high-fat treatment and this elevation was contained only by the longer treatment with propolis (Figure 2H).

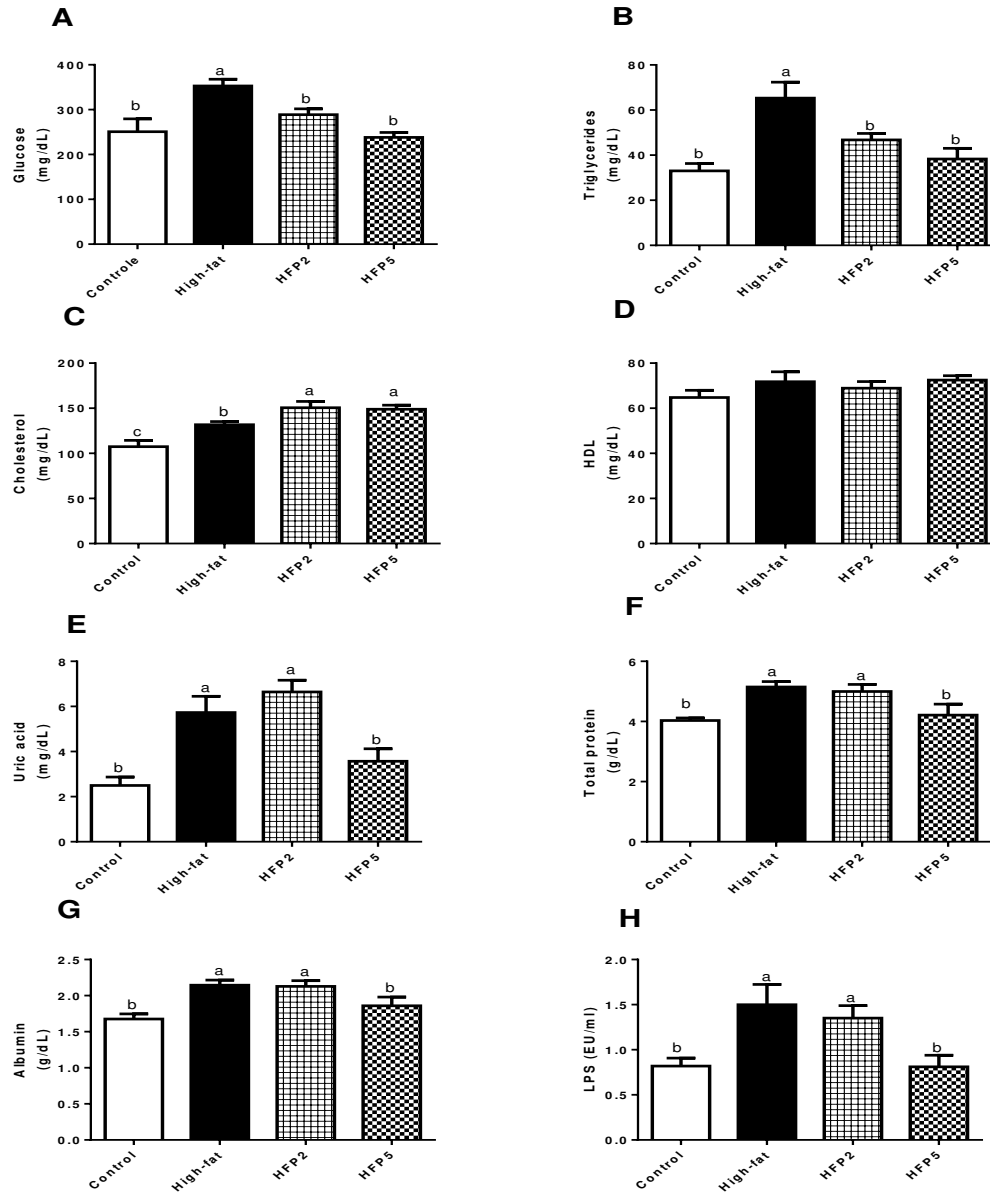


Figure 2. Effect of propolis on biochemical parameters and LPS. Serum concentration of: A) glucose; B) triacylglycerols; C) cholesterol; D) HDL: high-density lipoproteins; E) uric acid; F) total protein; G) albumin; H) LPS: lipopolysaccharide. Data are expressed as means $\pm$ SEM (Duncan test, $p < 0.05$). Different letters above bars denote that means are significantly different.

TLR4 activation and interleukin expression

In order to assess whether the reduction of LPS levels in the serum of animals corresponded to a normal inflammatory response, we investigated the activation of the TLR4 pathway in muscle. As shown in Figure 3 the group fed HF diet showed a greater activation of receptor TLR4 and its co-receptors (CD14 and MD-2) along with the increases in the expression of pathway intermediate interleukins (IL-6, IL-8 and IL-10) and TNF- α . The HF group also showed increased lipase expression. The HFP groups in turn exhibited a reduction in all evaluated inflammatory parameters.

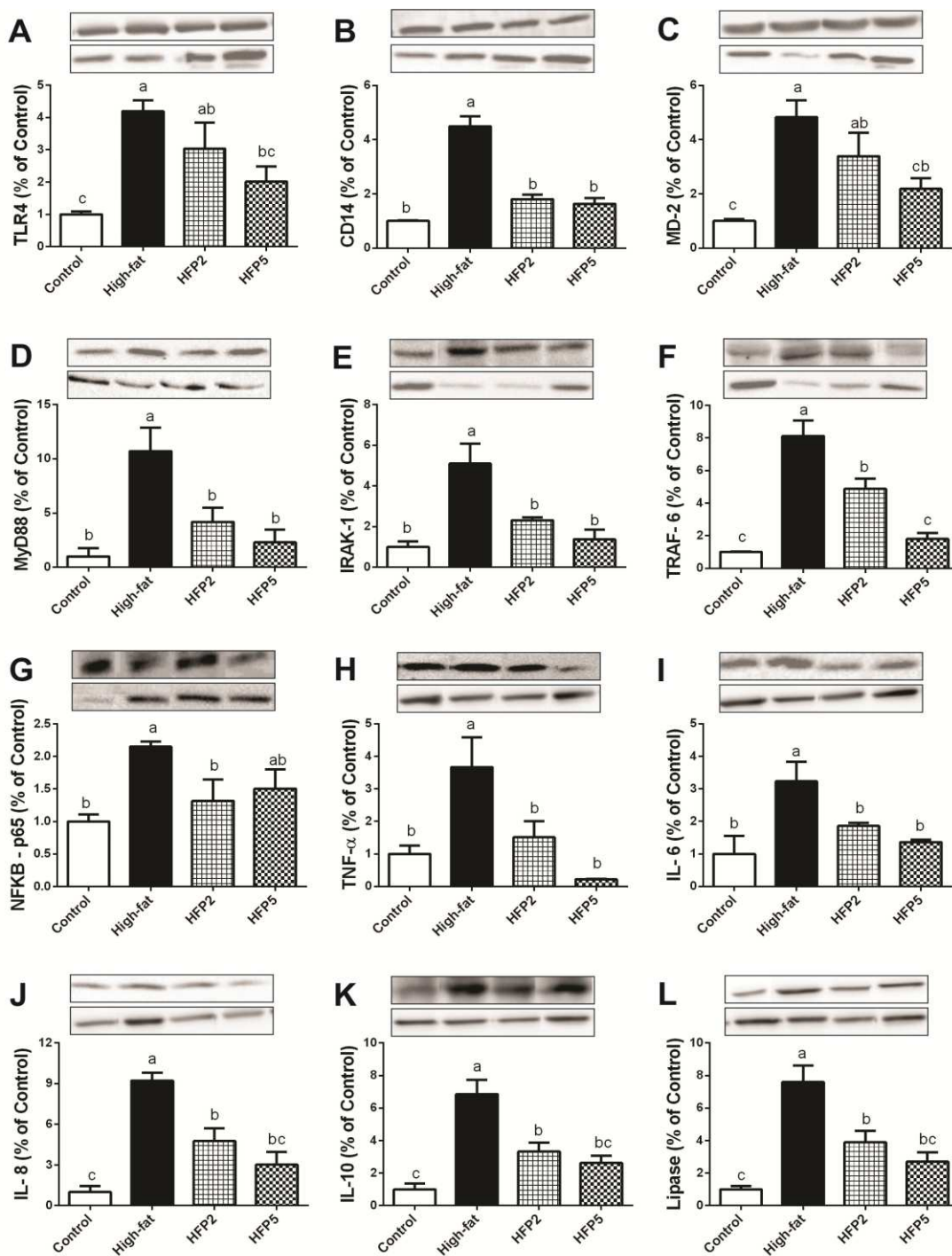


Figure 3. Effect of propolis supplementation on the TLR4 pathway. Values expressed in means $\pm$ SEM for the Western-blotting analyses of: A) TLR4; B) CD14; C) MD-2; D) MyD88; E) IRAK-1; F) TRAF-6; G) NFKB p-65; H) TNF- α ; I) IL-6; J) IL-8; K) IL-10; L) Lipase. Upper strips of bands correspond to the protein of interest while the lower strips correspond to reference α -tubulin. Criterion of significance was $p < 0.05$ (Duncan test). Different letters above bars denote significant differences.

Gut microbiota structure

The high-fat treatments had no influence on *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Verrucomicrobia* phyla. Phyla *Firmicutes* and *Themotogae* responded with a significant increase, whereas supplementation with propolis for 5 weeks resulted in readings that were undistinguishable from the control. The *Proteobacteria* phylum was significantly diminished by the high-fa diet (Figure 4). Bacterial genera, in turn, were also influenced by the longer-term treatment with propolis that promoted increases of *Bacteroids* and *Helicobacter*, and reduction of *Oscillopira* and *Blautia* (Figure 5).

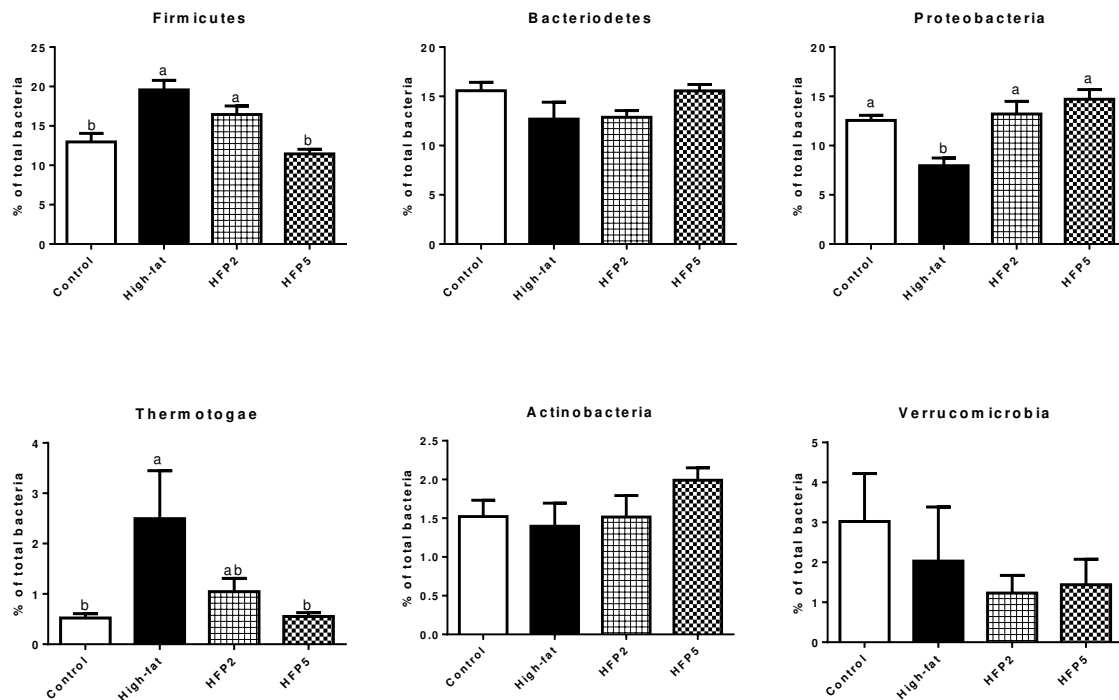


Figure 4. Identification of the predominant phyla in the cecal microbiota by 16S RNA. Different letters above bars denote significantly different means. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($p < 0.05$ by Duncan).

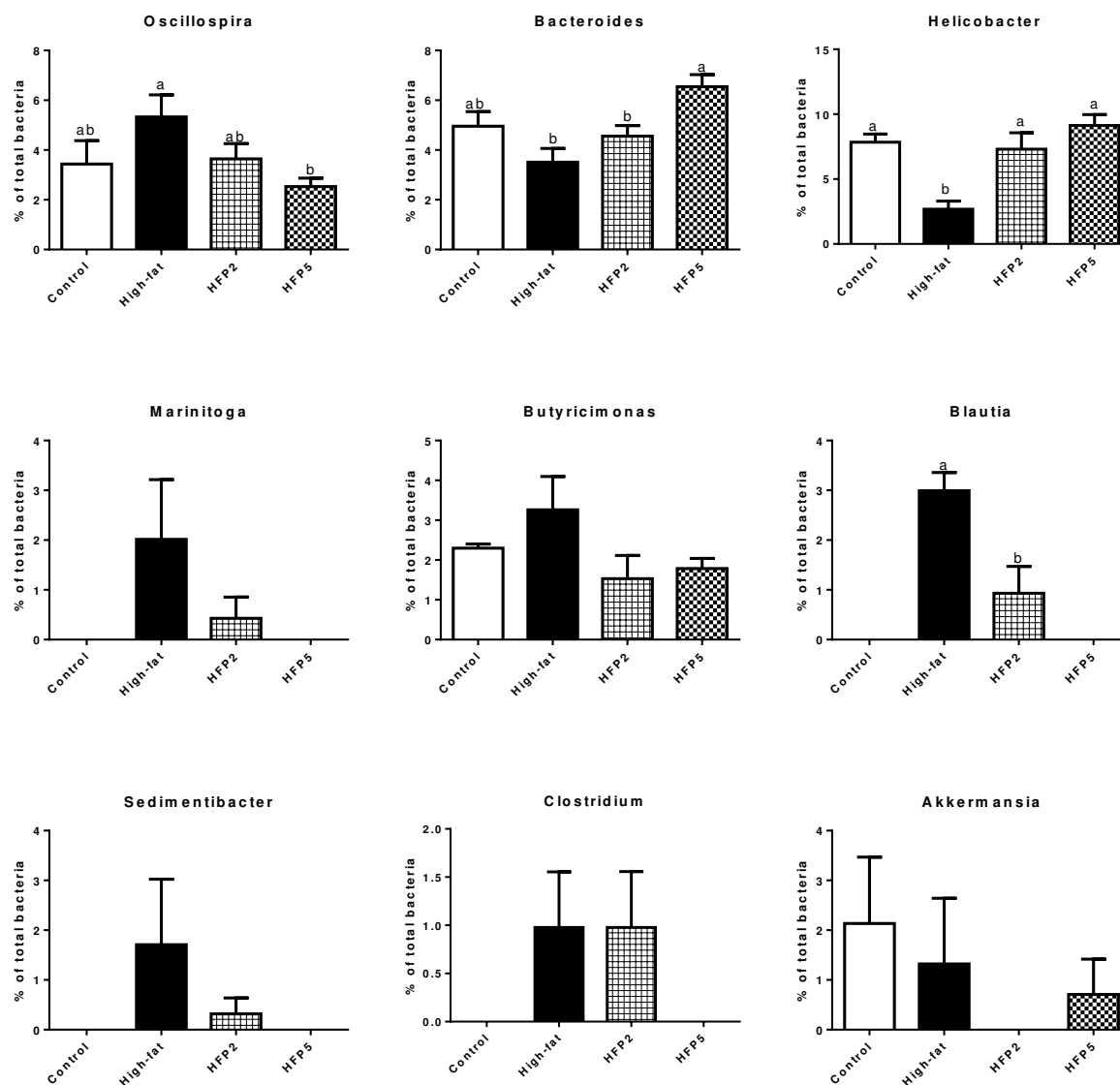


Figure 5. Identification of major genera classified in the cecal microbiota according to the 16S RNA. Different letters above bars denote that means are significantly different. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($p < 0.05$ by Duncan).

Discussion

Propolis is a complex resin of vegetable-animal origin with a highly variable composition and biological activities, which could be traced to both the botanical source of the pollen and the bee species (Buffalo *et al.*, 2013). The propolis

material here utilized was characterized by HPLC for this study and its components used to identify the material as belonging to Group 12 (*Baccharis dracunculifolia*, botanical species), from the 13 Brazilian groups reported by Park , Alencar, Aguiar (2002).

The high-fat diet is a technique that has been widely used to induce obesity in animal models because it acts on physiological processes of neuronal energy metabolism and regulation markers throughout the body. This study showed that treatment of mice with a high-fat diet for seven weeks was sufficient to produce the signs typical of the onset of obesity with regard to altered blood glucose, cholesterol and triacylglycerols, even before body weight changes become statistically significant. Here, we have shown that a 0.2% propolis supplementation for five weeks resists to changes of the above parameters, except for cholesterol. Additionally, high levels of circulating toxic serum lipopolysaccharide (LPS), as microbial by-products, were drastically reduced to normal levels after the 5-week treatment. Such suppression came along with a concomitant down-regulation of the TLR4 pathway. Our data suggest that ingested propolis can hold back events that attempt against the intestinal wall integrity by either preventing the proliferation of microbiota that attack mucin (Swidsinski *et al.*, 2007), or by passage of microbial components into the bloodstream thus diminishing the levels of inflammation (Cani *et al.*, 2009).

In addition, the reduction of lipase expression indicated a possible effect on lipolysis in the groups treated with propolis, consistent with the report of Ichi *et al.* (2009), which suggests that propolis has a promising effect on lipid metabolism, although this effect may not apply to cholesterol (Koya-Miyata *et al.*, 2009).

There is growing evidence about the therapeutic properties of propolis in chronic diseases as diabetes (Kitamura *et al.*, 2014), atherosclerosis (Daleprane *et al.*, 2012), inflammation (Machado *et al.*, 2012) and obesity (Koya-Miyata *et al.*, 2009) in animal models. These effects have been attributed to aglyconic flavonoids that are readily absorbed by the small intestine (Anklam, 1998; Hollman *et al.*, 1999). Moreover, prolonged exposure to high fat diets promote the growth of gram-negative bacteria (Kim *et al.*, 2012) capable of inhibiting the expression of junction

proteins thus increasing intestinal permeability (Cani *et al.*, 2008).

Great importance is currently given to increases in the ratio *Firmicutes* to *Bacteroidetes* in the intestinal microbiota as a result of high-fat diets (Hildebrandt *et al.*, 2009; Hattori *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2010). Shifts in bacterial dominance follow after metabolic derangements as body weight accretion, inflammation and insulin resistance so far attributed to the new dominant bacterial phyla (Backhead *et al.*, 2004). In the present work, the high-fat diet promoted an increase in the proportion of *Firmicutes* yet without a significant decrease in *Bacteroidetes* (Figure 4).

Diets with phenolic compounds have been reported to confer beneficial effects detectable by the modulation of microbiota capable of metabolizing such compounds thus affecting metabolic parameters (Espley *et al.*, 2014; Anhê *et al.*, 2014). Our results indicate that supplementation of the fatty diet with propolis helped the microbiota retain the general shape of the normal profile at least with respect to *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The plethora of microbes and interactions among microorganisms and with the host is so great that, at the moment, it should suffice to realize that both negative and positive features have been reported about the *Proteobacteria* phylum (Mukhopadhyay *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2014).

Other alterations in the profile were observed as a result of propolis supplementation such as a substantial increase of genera *Bacteroides* and *Helicobacter*, after 5 weeks of treatment. *Helicobacter pylori* is frequently associated with peptic ulcer (Ford *et al.*, 2004), although this species was also considered beneficial against esophageal reflux (Ritcher, Falk, Vaezi, 1998).

By the reduction of LPS found in this study it seems reasonable to expect that the flavonoids contained in propolis could reduce or prevent the increase of intestinal permeability regulated by tight Junctions. This junctional complex located at the apical and basolateral domains of epithelial cells are responsible for gut permeability and the effect of phenolic compounds has been highlighted for influencing on the structure and expression of junction proteins (Mercado *et al.*, 2013; Suzuki, Hara, 2011).

The TLR4 signaling is a fundamental step of the inflammatory cascade induced by LPS. Kim *et al.* (2012) have demonstrated that TLR4-deficient mice have lower levels of inflammatory cytokines when exposed to a high-fat diet. The stimulus of this pathway occurs through the recognition of LPS by CD14 and submission to the TLR4-MD2 complex, which in turn stimulates multiple signaling components like Myd88, IRAK, and TRAF-6. As a result of these events, phosphorylation of I κ B and NF- κ B translocation to the nucleus is permitted thus regulating the transcription of inflammatory cytokines (Mogensen, 2009; Park, Lee, 2013). Our results show that propolis lowers the inflammatory response through a diminished expression of the TLR4 pathway. Búfalo *et al.* (2013) did report the anti-inflammatory effect of propolis by holding back the unphosphorylated I κ B α and down-regulating NF- κ B, central to the inflammatory cascade, yet not in association to a high-fat diet.

In conclusion, the high-fat diet used in this study effectively induced the typical clinical signs of the onset of obesity, principally intestinal dysbiosis, increased concentration of circulating LPS and increased expression of the TLR4 pathway. However, intervention with propolis reshaped the gut microbiota to a point close to the normal profile resulting in the reduction of circulating LPS and inflammatory response by reducing the TLR4 overexpression. It would not be surprising that, in addition to the cell-signaling properties of propolis components, the known chemical properties of phenolic compounds would play an ancillary role in guaranteeing the stability of junction proteins and the integrity of the intestinal barrier.

Acknowledgments: the authors acknowledge the Brazilian CNPq for the graduate fellowships to ARR and NESM, CAPES PROAP grant to PPGAN-FEA, FAPESP's grants 2012/05859-7 + do MJ Saad.

References

- Al-Waili N, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y, Salom K (2012) Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int J Med Sci* 9: 793-800.
- Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, et al. (2014) A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 2014-307142.
- Anklam, E (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem* 63: 549-562.
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci* 101:15718-15723.
- Búfalo MC, Ferreira I, Costa G, Francisco V, Liberal J, et al.(2013) Propolis and its constituent caffeic supress LPS- stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. *J Ethnopharmacol* 149: 84-92.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
- Cani PD, Bibiloni C, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, et al. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481.
- Cani PD, Delzenne NM (2009) The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des* 15: 1546-1558.
- Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DM, Schenka AA, Latuf-Filho P, et al. (2012) Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia* 55: 2823-2834.
- Daleprane JB, Freitas VS, Pacheco A, Rudnick M, Faine LA., et al. (2012) Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J Nutr Biochem*, 23:557-566.

De Santis JTZ, Hugenholtz P, Keller K, Brodie EL, Larsem N, et al. (2006) NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 34: W394-W399.

Espley RV, Butts CA, Laing WA, Martell S, Smith H, et al. (2014) Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. *J Nutr* 144: 146-154.

Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, Stancukas MC, Laskowski, et al. (2014) Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in mouse model of high fat diet-induced obesity. *Plos One* 9: e92193.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, et al. (2011) National, regional and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377: 557-567.

Ford AC, Delaney BC, Forman D, Moyyedi P (2004) Eradication therapy in *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer disease: systematic review and economic analysis. *Am J Gastroenterol* 99: 1833-1855.

Hattori M, Taylor TD. (2009) The human Intestinal Microbiome: A new frontier of Human Biology. *DNA Res.* 16: 1-12.

Hildebrandt MA, Hoffman C, Sherril-Mix AS, Keilbaugh AS, Hamady M, et al. (2009) High-fat diets determines the composition of the murine gut micromobiome independently of obesity. *Gastroenterol* 137: 1716-2174.

Hollman PCH, Bijsman MNCP, Gameren YV, Cnossen EPJ, Vries JHM, et al. (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res* 31: 569-579.

Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, et al. (2009) The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Food Sci* 74: H127-H131.

Kim KA, Gu W, Lee IA, Jon EH, Kim DH (2012) High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *Plos One* 7: e47713.

Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Myiamoto T, Okamoto S, et al. (2014) Beneficial effects of brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice. *Adipocyte* 4:227-236.

Koya-Miyata S, Arai N, Mizote A, Taniguchi Y, Ushio S, et al. (2009) Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol Pharm Bull* 32: 2022-2028.

Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 71: 8228-8235.

Machado JL, Assunção AKM, Silva MCP, Reis AS, Costa GC, et al. (2012) Brazilian green propolis: Anti-inflammatory property by an Immunomodulatory activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 157652.

Mercado J, Valenzano MC, Jeffers C, Sedlak J, Cugliari MK, et al. (2013) Enhancement of tight junctional barrier function by micronutrients: compound-specific effects on permeability and claudin composition. *Plos One* 8: e78775.

Mogensen TH (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* 22: 240-273.

Moreira APB, Teixeira TFS, Ferreira AB, Peluzio MCG, Gonçalves RCG (2012) Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxemia. *Br J Nutr* 108: 801-809.

Mukhopadhyay I, Hansen R, El-Omar EM, Hold GL (2012) IBD – What role do Proteobacteria play? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 219-230.

Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O’Sullivan, et al. (2010) Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut* 59: 1635-1642.

Nakamura T, Ohta Y, Ohashi K, Ikeno K, Watanabe R, et al. (2012) Protective effect of Brazilian propolis against hepatic oxidative damage in rats with water-immersion restraint stress. *Phytother Res* 26: 1482-1489.

Park BS, Lee JO (2013) Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 45: e66.

Park YK, Ikegaki M, Abreu JAS, Alcici NMF (1998) Study of the preparation of propolis extracts and its applications. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18.

Park YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002) Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* 50: 2502–2506.

Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, et al. (2013) The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17: 323-333.

Reeves P, Nielsen FH, Fahey JGC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.

Richter JE, Falk GW, Vaezi MF (1998) *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease : the bug may not be all bad. *Am J Gastroenterol* 93: 1800-1802.

Suzuki T, Hara H (2011) Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem* 22: 401-408.

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, et al. (2007) Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut*. 56:343–350.

Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, Gopalacharyulu P, Yetukuru L, et al. (2010) The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J Lipid Res* 51: 1101-1112.

CONCLUSÃO GERAL

5 CONCLUSÃO GERAL:

A utilização da própolis com finalidade anti-inflamatória foi confirmada pela redução da expressão do receptor TLR4 e de citocinas pró-inflamatórias em músculo. Além disso, as reduções dos níveis de LPS no soro dos animais indicam que os flavonoides atuam sobre a expressão de proteínas reguladoras da permeabilidade intestinal. Talvez as configurações aglicona dos flavonoides presentes na própolis facilitem ou auxiliem a expressão das proteínas de junção no intestino delgado, principal local onde as agliconas são absorvidas. Outro possível mecanismo envolvido é a utilização de componentes da própolis como substratos para fermentação bacteriana, modulando a estrutura da microbiota e influenciando a integridade da barreira intestinal.

Ainda, apesar da própolis não provocar alterações sobre o peso e adiposidade, a suplementação promoveu redução significativa sobre a glicemia e triacilgliceróis demonstrando seu efeito regulatório sobre o metabolismo, bem como melhora de parâmetros como ácido úrico, albumina e proteínas totais no camundongo. O consumo de dieta pelo grupo controle foi superior a dos grupos tratados com dieta hiperlipídica, consequência esta atribuída ao fato de que o excesso de gordura dietética é um importante supressor de consumo através da secreção de peptídeos de saciedade. O peso corporal é determinado pelo balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Dessa forma, a paridade dos pesos corporais dos grupos experimentais foi decorrente da menor ingestão de dieta pelos grupos hiperlipídicos.

O uso constante da própolis pela medicina popular conduziu a novas pesquisas que elucidaram diversas propriedades benéficas à saúde. Os resultados deste estudo reforçam achados anteriores sobre a ação anti-inflamatória. Entretanto, pesquisas futuras são necessárias para investigar sua ação sobre a integridade da barreira intestinal, assim como o aprofundamento dos conhecimentos sobre os componentes da própolis, de forma a garantir uma padronização da sua constituição e assegurar os efeitos biológicos esperados.

Embora o efeito da própolis sobre a regulação da via do TLR4 tenha sido pouco explorado até o momento, é possível pensar que esse produto natural

auxilie no tratamento de patologias como doenças inflamatórias intestinais, sepse, resistência insulínica e diabetes.

ANEXOS

6 ANEXOS

Anexo 01

Compostos identificados na própolis (Walker, Crane, 1987).

Compostos	
1-Flavonoides	Nome químico da substância
Crysina	5,7-dihidroxi flavona
Tectocrysina	5-hidroxi-7-metoxiflavona
Acacetina	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona
-	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona
Quercetina	3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona
Kaempferide	3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona
Rhamnocitrina	3,4',5-trihidroxi-7-metoxiflavona
-	3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona
Galangina	3,5-7-trihidroxi flavona
Isalpinina	3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona
Ermanina	5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona
Pectolinarigenina	5,7-dihidroxi-4',6-dimetoxiflavona
Pinostrobina	5-hidroxi-7-metoxiflavona
-	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona
Pinocembrina	5,7-dihidroxi flavona
Sakuranetina	4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona
Isosakuranetina	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona
Quercetina-3,3'-dimetil éter	4',5,7-trihidroxi-3,3'-dimetoxiflavona
Pinobanksina	3,5,7-trihidroxi flavona
3-acetil pinobanksina	5,7-dihidroxi-3-acetil flavona
Betuletol	3,5,7-trihidroxi-4',6-dimetoxiflavona
Isorhamnetina	3,5,4',7-tetrahidroxi-5'-metoxiflavona
Kaempferol	3,4',5,7-tetrahidroxiflavona
Apigenina	4',5,7-trihidroxi flavona
Rhamnazina	3,4',5-trihidroxi-5',7-dimetoxiflavona
Rhamnetina	7-metilquercetina
Alnusina	3,5,7-trihidroxi-6-metoxiflavona
-	4',5,7- trihidroxi-6-metoxiflavona
-	5,7-dihidroxi-3,4',6-trimetoxiflavona
-	3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona
-	3,4',5-trihidroxi-3',7-dimetoxiflavona
-	7-metoxiquercetina
-	3,7-dimetoxiquercetina

-	5,7-dihidroxi-3-metoxiflavona
Alpinetina	7-hidroxi-5-metoxiflavona
-	3,7-dihidroxi-5-metoxiflavona
-	2,5-dihidroxi-7-metoxiflavona
Alnusitol	3,5,7-trihidroxi-6- metoxiflavona

2-Calconas

2,6-dihidroxi-4-metoxichalcona
2,4',6-trihidroxi-4-metoxichalcona

3-Ácido benzóico e derivados

Ácido Benzóico
Ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico)
Ácido 4-hidroxibenzóico
Ácido 4-metoxibenzoico
2-amino -3- metoxibenzóico
Ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzóico)
Ácido protocatecuico (ácido 3,4 dihidroxibenzóico)
Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico)
Fenil metil ester de ácido benzoico
Fenil metil ester de ácido salicílico
Trans-p-coumaril benzoato
Trans-coniferil benzoato

4-Derivados de benzaldeído

Vanilina
Isovanilina

5-Álcool cinamil, ácido cinâmico e derivados

Álcool cinamil
Ácido cinâmico
Ácido 3,4-dimetoxicinâmico
Ácido o-cumárico
Ácido p-cumárico
Ácido cafeico
Ácido hidrocafeico
Ácido felúrico
Ácido isofelúrico
Metil éster de ácido cinâmico
Etil éster de ácido cinâmico
1,3 –diferuloil- 2 acetilglicerol
1-feruloil-3p-coumaroil-2-acetilglicerol

Ácido acético cinamilideno

6- Outros ácidos e derivados

Metil éster de ácido 2,8- dimetilundecanóico
--

Fenil metil éster de ácido 14- metilpentadecanóico

Etil ester de ácido palmítico (ácido hexadecanóico)
--

Ácido Muriático (ácido tetradecanóico)
--

Ácido sórbico (ácido 2,4-hexadienóico)
--

Butil-2-metilpropil éster de ácido ftálico
--

Ácido esteárico

Metil éster de ácido alnustico

7- Álcoois, cetonas, fenóis, e compostos heteroaromáticos
--

Álcool benzil

Álcool 3,5-dimetoxibenzil

1,5-pentanediol monobenzoato

6,10,14-trimetil-2-pentadecanóico

2-heptadecanona

4-alil-2-metoxifenol

Acetato de hexadecanol

Pterostilbeno

Xanthorrhoeol

Coumarino

Scopoletol

3,5-dihidroxistilbeno (pinosylvino)

8-Terpeno e álcoois sesquiterpenos e seus derivados
--

Geraniol

Nerolidol

Guaiol

Farnesol

Dihidroeudesmol

β -bisabolol

α -acetoxibetulenol

9- Sesquiterpenos e triterpenos –hidrocarbonetos

β -bourboneno

Cariofileno

Patchoulane

Seleneno

Aromadendreno

Calareno

Copaeno
Calameneno
β -patchoulene
β -bisabolenol
Squaleno
10- Hidrocarbonetos alifáticos
Eicosano
Eicosino
Heneicosano
1-octadeceno
Tricosano
Pentacosano
11- Minerais
Na
K
Mg
Ca
Ba
Sr
Zn
Cd
Al
Si
Sn
Pb
Fe
Ni
Cr
Mn
Ti
Ag
Cu
Co
Mo
V
12- Hidrocarbonetos esteróis e esteroides
Cholestrileno
Cholinasterol
Stigmasterol
β -dihidrofucosterol

Lanosterol
Cholesterol

13- Açúcares

d-ribofuranose
d-frutose
d-glucitol
d-gulose
Talose
Sacarose
d-glicose

14- Aminoácidos

WALKER, P.; CRANE, E. **Constituents of Propolis**. Apidologize, v. 18, p.327-334, 1987.

Anexo 02:



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

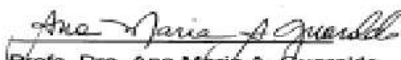
CERTIFICADO

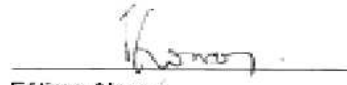
Certificamos que o projeto "Efeito da suplementação de própolis sobre marcadores inflamatórios e estrutura da microbiota intestinal de camundongos" (protocolo nº 3015-1(A)), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán / Aline Rissetti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de dezembro de 2013.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 04 de dezembro de 2013.


Prof.ª. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alongo
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 5109
13063-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceua/>