

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES URI-ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO CLÍNICA COM ÊNFASE EM
ESTÉTICA

JAINÉ ANDRESSA MOZ

**PROPRIEDADES DO PRÓPOLIS, RELAÇÃO COM A OBESIDADE E A
MICROBIOTA INTÉSTINAL**

ERECHIM -RS
2017

JAINE ANDRESSA MOZ

**PROPRIEDADES DO PRÓPOLIS, RELAÇÃO COM A OBESIDADE E
A MICROBIOTA INTESTINAL**

Artigo científico apresentado ao Curso de Pós Graduação em Nutrição Clínica com ênfase em Estética, como requisito parcial para obtenção do título de pós-graduada em Nutrição Clínica com ênfase em Estética, Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai das Missões, URI-Erechim.

Orientadora: Prof^a. Ma. Marta Beatriz Santolin

ERECHIM - RS

2017

**PROPRIEDADES DO PRÓPOLIS, RELAÇÃO COM A OBESIDADE E
A MICROBIOTA INTESTINAL**

PROPERTIES OF PROPOLIS, RELATION WITH OBESITY AND INTESTINAL
MICROBIOTA

Jaine Andressa Moz^{a,*}, Marta Beatriz Santolin^a

^a Departamento Ciências da Saúde Curso De Nutrição, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões (URI), Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil

^{a*} Autor Correspondente: Rua Avenida Sete de Setembro, 1621, Centro, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil. Tel.: +54 35209000.

Email: nutricionistajainemoz@gmail.com (J.A.Moz)
martasantolin@hotmail.com (M.B.Santolin)

PROPRIEDADES DO PRÓPOLIS, RELAÇÃO COM A OBESIDADE E A MICROBIOTA INTESTINAL

PROPERTIES OF PROPOLIS, RELATION WITH OBESITY AND INTESTINAL MICROBIOTA

RESUMO

Objetivo: O objetivo desta revisão bibliográfica foi apresentar informações relevantes sobre as propriedades do própolis e sua relação com a obesidade e a microbiota intestinal.

Metodologia: Realizou-se uma pesquisa na literatura científica com busca em artigos científicos aos bancos de dados eletrônicos das plataformas Pubmed, SciELO, Science Direct, Biblioteca Virtual em Saúde publicados no período de 2012 a 2017, usando palavras chaves; própolis, obesidade, inflamação, antioxidante, intestino, microbiota intestinal, obesity, inflammation, overweight, intestine.

Resultados e Discussão: A obesidade é uma desordem nutricional, levando ao estado de inflamação crônica de baixo grau dos tecidos adiposos, que por sua vez é o regulador de muitos transtornos crônicos, devido ao aumento da produção de citocinas secretada por macrófagos e pré-adipócitos. A microbiota intestinal, assim como o processo inflamatório e o estresse oxidativo estão relacionados com o excesso de peso, assim como com o desenvolvimento da obesidade e as demais doenças crônicas não transmissíveis. A própolis possui amplo espectro de componentes bioativos, sendo amplamente utilizada como alimento saudável/funcional devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo imunomoduladores, antitumorais, anti-inflamatório, antioxidante e antibacteriano

Conclusão: Sugere-se que a obesidade associada a microbiota intestinal e ao estado de inflamação crônica de baixa intensidade, está propensa ao desenvolvimento de várias doenças debilitantes, devido ao hipercrecimento de patógenos que conduz ao estado de inflamação. O uso de alimentos funcionais

como a suplementação do extrato de própolis pode ser uma alternativa para tentar atenuar a obesidade e a disbiose intestinal através de suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, e antibacteriano.

Palavras chaves: Obesidade, microbiota intestinal, própolis.

Abstract

Objective: The objective of this bibliographic review was to present relevant information on propolis properties and its relation with an intestinal microbiota and obesity.

Methodology: A literature search was carried out in search of scientific articles for the electronic databases of the Pubmed, SciELO, Science Direct, platforms, Virtual Health Library published in the period from 2012 to 2017, using key words; Propolis, obesity, inflammation, antioxidant, intestine, intestinal microbiot, overweight.

Results and Discussion: Obesity is a nutritional disorder, leading to chronic low-grade inflammation of adipose tissues, which in turn is the regulator of many chronic disorders, due to increased production of cytokines secreted by macrophages and pre-adipocytes. The intestinal microbiota, as well as the inflammatory process and oxidative stress are related to overweight, as well as to the development of obesity and other non-transmissible chronic diseases. Propolis has a broad spectrum of bioactive components and is widely used as a healthy/functional food because of its biological and pharmacological properties, including immunomodulators, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial.

Conclusion: It is suggested that obesity associated with intestinal microbiota and chronic inflammation of low intensity, is prone to the development of several debilitating diseases, due to the hypergrowth of pathogens leading to the state of inflammation. And that the use of functional foods such as propolis extract supplementation may be an alternative to try to ameliorate / prevent obesity and intestinal dysbiosis through its anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial properties.

Key words: Obesity, microbiot intestinal, propolis.

1. Introdução

O metabolismo humano é dependente do funcionamento sincronizado de inúmeras reações químicas com o objetivo de manter a homeostase corporal. O desequilíbrio energético é uma das formas de desestabilizar a homeostase e, de forma crônica, é capaz de gerar alterações na composição corporal sendo que o exemplo mais evidente nos dias atuais é a obesidade¹.

A obesidade induz a produção de citocinas inflamatórias e a infiltração de células imunitárias no tecido adiposo, o que determina um estado de inflamação crônica de baixo grau², que se caracteriza por um aumento nos níveis de alguns hormônios circulantes e nutrientes, como a leptina, glicose e ácidos graxos livres, dentre outras alterações metabólicas³. Acredita-se que, além de estar relacionada com um quadro de inflamação, o excesso de peso intensifica o estresse oxidativo e leva a produção de mediadores inflamatórios gerados pela ação dos radicais livres que contribuem para manter o estado pró-inflamatório, como a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), proteína C reativa (PCR), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), interleucina 6 (IL-6), o inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)⁴.

Uma das principais características da inflamação observada em obesos é a migração de células, principalmente macrófagos, para o tecido adiposo⁵. Cada excesso de quilograma de gordura humana resulta no acúmulo estimado de 20-30 milhões de macrófagos. Um mecanismo primário através do qual os macrófagos regulam a inflamação é através da produção de potentes mediadores lipídicos bioativos referidos como oxilípidos⁶.

A inflamação e o estresse oxidativo ocorrem quando o fornecimento de energia começa a exceder a capacidade de armazenamento de adipócitos e, como resultado, ocorre a hipertrofia⁷, a qual conduz uma libertação elevada de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo e, eventualmente, atinge a circulação e outros órgãos.⁸

O estresse oxidativo é uma condição definida como o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, sendo consequência principalmente do aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), aumento da geração de radicais livres e da diminuição de antioxidantes endógenos. Dessa forma as citocinas pró-inflamatórias são superexpressas na obesidade⁹.

Os determinantes da obesidade são múltiplos, envolvendo fatores genéticos e ambientais, dentre os quais se destacam as dietas com alta densidade energética e a inatividade física, além do papel das bactérias que colonizam o intestino humano como agentes etiopatogênicos desta e de outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs)⁷. Recentemente têm-se atribuído a composição da microbiota intestinal a fatores ambientais para o controle do peso corporal¹⁰, uma vez que o intestino é considerado importante local de interação antigênica, e está em constante contato com microrganismos comensais, patogênicos, bem como moléculas derivadas de alimentos ingeridos¹¹.

A microbiota intestinal pode ser retratada como um órgão microbiano que contribui para a homeostase¹²; suas funções são múltiplas, diversificadas e incluem defesa contra patógenos intestinais, imunidade, desenvolvimento das microvilosidades, fermentação da fibra alimentar não digerível e alguns nutrientes (amido resistente ou oligossacarídeos), metabolismo anaeróbico de peptídeos e proteínas, biotransformação do conjugado de ácidos biliares, degradação de oxalato de bases complexas, bem como a síntese de algumas vitaminas, como B12 e K^{13,14}.

O processo de disbiose caracteriza-se pela alteração na estrutura e/ou função da microbiota capaz de produzir efeitos prejudiciais¹⁵, interferindo profundamente na integridade do intestino, caracterizado por uma disfunção colônica, na qual ocorre predomínio das bactérias patogênicas sobre as bactérias benéficas¹⁶, assim a produção de toxinas e aumento da permeabilidade intestinal, resulta em alterações imunológicas e hormonais. Desta forma, hábitos de vida como dieta, estresse e uso de antibióticos, por exemplo, fazem com que a microbiota transitória prevaleça sobre a residente, predispondo a distúrbios gastrintestinais¹⁷.

É crescente a busca pela alimentação equilibrada contendo alimentos com propriedades funcionais. Estes apresentam componentes naturais biologicamente ativos capazes de promover e prevenir o desenvolvimento de doenças¹⁷.

Um dos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido o própolis, um composto resinoso coletado e sintetizado pelas abelhas. O própolis é uma das poucas substâncias naturais a permanecer popular ao longo dos anos e desde antes de 300 a.C.¹⁸.

O própolis é uma mistura complexa processada por abelhas das resinas coletadas de brotos, folhas e exsudados de diferentes plantas, como álamo, videeiro, castanheiro, aliso, faia e coníferas. Atraiu o interesse dos pesquisadores e também aparece extensamente na coluna de composição como um aditivo em alimentos saudáveis, bebidas e suplementos nutricionais para melhoria da saúde e prevenção de várias doenças devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo imunomoduladores, antitumorais, anti-inflamatório, antioxidante e antibacteriano^{19,20}.

Diante do exposto, esta revisão objetivou apresentar informações relevantes sobre as propriedades do própolis e a sua relação com a obesidade e a microbiota intestinal.

2. Metodologia

Realizou-se uma pesquisa na literatura científica com busca em artigos científicos aos bancos de dados eletrônicos das plataformas Pubmed, SciELO, Science Direct, e Scopus publicados no período de 2012 a 2017, usando palavras chaves; própolis, obesidade, inflamação, antioxidante, intestino, microbiota intestinal, obesity, inflammation, overweight, gut, a pesquisa foi subdivida em temas, ocorreu durante os meses março a julho de 2017, classificada como uma pesquisa de caráter qualitativo e teórico.

3. Resultados e Discussão

3.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta biológica de tecidos á injúrias. O processo inflamatório agudo inicia quando as células detectam uma injúria, e então, liberam mediadores químicos chamados citocinas. Tem sido avaliado que o estado inflamatório induzido por excesso metabólico é característico e fora do paradigma da inflamação clássica, definida pelos sinais básicos de rubor, edema, calor e dor²¹.

No processo inflamatório, os macrófagos no tecido adiposo liberam quimioatratores para macrófagos, o que causa a natureza crônica da inflamação. Neste processo, parece que o MCP-1, também conhecido como CCL2 e seu receptor CCR2, desempenha um papel fundamental. O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo desempenha um papel importante no aumento dos mediadores inflamatórios (IL-8, IL-6, IL-1, TNF- α , entre outros), o que, juntamente com um alto grau de estresse oxidativo, hipoxia e lipólise nos adipócitos, causa uma produção aumentada de adipocitocinas, o que resultará em doenças metabólicas e imunológicas²².

A resposta clássica está associada com o aumento da taxa metabólica basal e apresenta uma resposta rápida e focada do sistema imune para o local de lesão ou infecção. Geralmente, o insulto é removido ou neutralizado e a inflamação é atenuada. Todavia, a resposta inflamatória encontrada no estado de obesidade é de natureza diferente²³.

As citocinas são proteínas solúveis de sinalização celular secretadas por diversos tipos de células, atuam por mecanismo autócrino e parácrino, em vários tipos celulares. As citocinas podem apresentar redundância (várias citocinas exercendo a mesma função), sinergismo (diversas citocinas atuando em conjunto com a mesma finalidade), antagonismo (ação de uma citocina anula outras) e pleiotropia (uma mesma citocina agindo em distintas células). Podem atuar umas sobre as outras regulando a produção e atividade, aumentando ou diminuindo a resposta inflamatória, designadas pró-inflamatórias ou antiinflamatórias, respectivamente²⁴.

Podem ainda ser produzidas e secretadas por adipócitos, sendo denominadas adipocinas, onde seus níveis séricos refletem na quantidade de tecido adiposo²⁵.

Na obesidade o estado inflamatório é considerado crônico de baixo grau, o que se deve ao aumento dos níveis circulantes de adipocinas (ADPCs), diretamente proporcional ao grau de obesidade. Esse fato levou à formulação da hipótese de que na obesidade ocorre a desregulação pró-inflamatória das ADPCs e constituindo a ligação patogênica entre obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares²⁶.

3.2 Obesidade e inflamação

Na década de 1990, a obesidade foi reconhecida como uma doença inflamatória, após um primeiro estudo, realizado com ratos, o qual demonstrou maior expressão do gene codificador da adipocina pró-inflamatória, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) no tecido adiposo, além de uma redução da sensibilidade à insulina após exposição a uma dieta de ganho de peso²⁷.

A obesidade é uma desordem nutricional emergente a nível mundial e é caracterizada por um desequilíbrio de energia que resulta em hipertrofia de adipócitos e, em seguida, hiperplasia, levando ao estado de inflamação crônica de baixo grau dos tecidos adiposos, que por sua vez é o regulador de muitos transtornos crônicos, devido ao aumento da produção de citocinas secretada por macrófagos e pré-adipócitos²⁸.

Dentre as adipocinas com ações pró-inflamatórias na obesidade, destaca-se TNF- α , a leptina e a resistina. O TNF- α é uma citocina, isolada pela primeira vez em 1975 por Carswell e colaboradores²⁹, e está presente na resposta imunológica mediada por células. É sintetizado por macrófagos no tecido adiposo de animais e humanos obesos. Desta forma, encontra-se elevado na obesidade. O TNF- α tem efeitos distintos sobre o tecido adiposo, incluindo a indução de resistência à insulina, produção de leptina, estimulação da lipólise, supressão de lipogênese e comprometimento da diferenciação de pré-adipócitos *in vitro*. Esses efeitos contribuem para a diminuição do tamanho e número dos adipócitos limitando o aumento da massa de gordura²⁶. Prins et

al. mencionaram que para tentar controlar a adiposidade o TNF- α induz a apoptose dos pré adipócitos humanos o que agrava a inflamação existente.

É possível que a inflamação seja uma resposta do organismo para tentar conter o aumento no tamanho do adipócito, já que resistência insulínica quando induzida pelas citocinas inflamatórias e liberadas pelo tecido adiposo diminui a capacidade dos adipócitos em armazenar gordura³⁰.

Nos estados pró-inflamatórios relacionados à obesidade, o aumento do tamanho dos adipócitos desempenha um papel decisivo, porque, na medida em que aumenta o tecido adiposo, a produção de adipocitocinas desencadeando uma série de processos fisiopatológicos relacionados à inflamação¹². Um dos processos envolvidos na inflamação é quando neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos se infiltram no tecido adiposo. A hipertrofia de adipócitos ocorre na obesidade, o que leva ao aumento da produção de uma série de adipocinas / quimiocinas / citocinas pró-inflamatórias por adipócitos e outras células presentes no tecido adiposo²².

Adipocina é um termo universal adotado para descrever a proteína que é sintetizada e secretada pelo tecido adiposo, sendo altamente diversificada em termos de estrutura protéica e função fisiológica. Elas incluem citocinas clássicas, fatores de crescimento e proteínas sistêmicas complementares envolvidas na regulação da pressão arterial, homeostase vascular, metabolismo lipídico, glicídico e angiogênese³¹. As adipocinas compreendem proteínas relacionadas ao sistema imune fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), fatores de crescimento (fator de crescimento transformador β -TGF- β) e proteínas da via alternativa do sistema complemento (adipsina)³².

A presença de resposta inflamatória crônica juntamente com os fatores prejudiciais ao metabolismo liberados pelo tecido adiposo na circulação está associada a várias complicações metabólicas da obesidade, como DM2 e aterosclerose acelerada implicando na resistência à leptina / insulina, na homeostase de energia interrompida e nas doenças neurodegenerativas³³. A inflamação quando induzida pela obesidade ocorre não apenas no tecido periférico, mas também nas áreas do sistema nervoso central, como hipotálamo, o qual regula o equilíbrio energético através da integração de

sinais periféricos e neuronais de saciedade e nutrientes e, portanto, regula a ingestão de alimentos, o gasto energético e o metabolismo³⁴.

Os humanos têm um repertório genético limitado para a digestão e absorção de hidratos de carbono complexos. As bactérias são capazes de metabolizar hidratos de carbono complexos e produzir ácidos gordos de cadeia curta (short chain fatty acids – SCFA) (AGCC) como acetatos, propionatos e butiratos. Os ácidos gordos de cadeia curta podem ser facilmente absorvidos por difusão e contribuir para um maior rendimento calórico dos alimentos. Os AGCC podem ligar-se ao recetor acoplado da proteína G (Gpr41/42), e esta molécula aumenta as secreções do peptídeo YY (PYY). O PYY retarda a motilidade do trato gastrointestinal e favorece a absorção dos AGCC. Um aumento na captação de energia leva a um equilíbrio energético positivo, e com o passar do tempo à obesidade. Os AGCC produzidos pela microbiota intestinal podem afetar a comunicação neural cérebro-intestino³⁵.

Dessa forma a microbiota intestinal tem sido alvo de estudos que apontam a participação de bactérias intestinais no metabolismo energético e, conseqüentemente, no desenvolvimento de obesidade e outros distúrbios metabólicos^{36, 37,38}.

3.4 Microbiota intestinal e obesidade

As interações entre os micróbios intestinais e as respostas do hospedeiro podem afetar o ganho de peso, a sensibilidade á insulina e o estado inflamatório não somente do intestino, mas também dos órgãos periféricos²⁴.

O TGI humano, especialmente o cólon, é densamente povoado por fungos, bactérias e vírus. A este ecossistema, dá-se o nome microbiota intestinal, que se estima conter 100 trilhões de microrganismos, número dez vezes maior que a quantidade de células humanas^{39,40,41}. Altamente diversificada, apresenta uma composição específica individual, determinada pelo genótipo do hospedeiro e fatores ambientais. Ao redor de 15.000 a 36.000 espécies de bactérias já foram identificadas no trato gastrointestinal humano, sendo os filós mais comumente encontrados, o *Firmicutes* (espécies como *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*), o *Bacteroidetes* (espécie como

Bacteroides), o Proteobactérias (espécie como *Escherichia coli*) e *Actinobactéria* (espécie como *Bifidobacterium*)⁴².

O TGI humano 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 imune⁴³. Pesquisas realizadas por Larsen e Koeth^{36, 37} sugerem que as bactérias que colonizam o intestino humano possam desempenhar um papel de destaque na gênese da obesidade e de outras DCNT's como diabetes tipo 2 e aterosclerose.

A microbiota intestinal tem a capacidade de estabelecer uma relação fisiológica, mutualista e equilibrada com o ser humano (hospedeiro), desempenhando várias funções, não só no nível da digestão e absorção dos nutrientes provenientes da dieta, como também no que concerne à manutenção da integridade do sistema imunitário⁴⁴. Estudos vêm mostrando a associação da microbiota intestinal com o estado de inflamação na obesidade⁴⁵, devido o hipercrecimento de patógenos conduzindo a um estado de inflamação crônica, que por sua vez induz mutações, inibe a apoptose ou estimula a angiogênese e a proliferação celular⁴⁶. Um processo de disbiose causa ainda a biossíntese de genotóxicos que interferem com regulação do ciclo celular, a produção de metabolitos tóxicos ou ativação de aminas heterocíclicas, compostos pró-carcinogênicos alimentares⁴⁷.

Alterações na colonização bacteriana intestinal podem ocorrer por fatores diversos, internos ou externos ao hospedeiro, incluindo o tipo de parto, a alimentação, o uso de antibióticos, de prebióticos e de probióticos, fatores genéticos, idade, estresse, entre outros⁴⁸.

Evidências apontam diferenças na microbiota intestinal de indivíduos eutróficos e de indivíduos obesos. Dentre as diferenças encontradas, pode-se destacar a alteração na proporção dos filos, com diminuição significativa de *Bacteroidetes* e uma maior proporção de *Firmicutes*, diminuição significativa na concentração de *Rhuminococcus flavefaciens*, de *Bifidobacterium* e do gênero *Methanobrevibacter* uma menor proporção do filo *Verrucomicrobia* assim como a diminuição significativa da diversidade microbiológica⁴⁹.

As bactérias do intestino são capazes de produzir uma variedade de vitaminas, sintetizar todos os aminoácidos essenciais e não essenciais e realizar a biotransformação da bÍlis. Além disso, o microbioma fornece as vias

bioquímicas vitais para o metabolismo de hidratos de carbono não digeríveis, que incluem grandes polissacáridos, tais como amido resistente, celulose, hemicelulose, pectinas e gomas; alguns oligossacarídeos que escapam à digestão; açúcares e álcoois não absorvidos a partir da dieta⁵⁰. Esta funcionalidade resulta na recuperação de energia e substratos absorvíveis para o hospedeiro e num fornecimento de energia e nutrientes para o crescimento e proliferação bacteriana. O metabolismo dos hidratos de carbono é a maior fonte de energia no cólon. Os microrganismos libertam ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) a partir de fibras da dieta, uma importante fonte de energia para a mucosa intestinal e críticos na modulação de respostas imunes e tumorigênese no intestino⁵¹.

Dessa forma, a microbiota intestinal, assim como o processo inflamatório e o estresse oxidativo estão sendo amplamente estudados, por apresentarem relação com o excesso de peso, assim como com o desenvolvimento da obesidade e as demais doenças crônicas não transmissíveis. O desenvolvimento de produtos que tenham como objetivo modular esses fatores se faz cada vez mais necessário. O uso de prebióticos e os alimentos funcionais têm sido recomendados, pois estimulam o crescimento de bactérias benéficas, conseqüentemente diminuem o processo inflamatório e apresentam compostos bioativos que atuam na capacidade antioxidante, sendo importante para a homeostase do organismo⁴³.

3.5 Própolis

A utilização de produtos da medicina complementar e alternativa (CAM) em tais tipos de infecções é popular. Efeitos semelhantes podem ser adotadas para o uso nutricional de produtos fitoterápicos também. Dois produtos de abelha, própolis e geléia real, têm sido utilizados em todo o mundo como nutrientes tradicionais e etnofarmacológicos desde os tempos antigos. Ambos têm muitos ingredientes ativos que são conhecidos pela sua eficácia em várias condições médicas. Sugere-se, por exemplo, que o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) da própolis é responsável por efeitos conhecidos do própolis, incluindo anticancerígenos, antioxidantes, imunomoduladores, antibacteriano, antiviral e anti-inflamatório. Como um antioxidante solúvel em lipídios, o CAPE

tem sido utilizado em várias doenças inflamatórias e infecciosas como medicina tradicional^{52, 53}.

O própolis possui amplo espectro de componentes bioativos⁵⁴, como compostos polifenólicos, principalmente flavonóides e ácidos fenólicos⁵⁵ sendo amplamente utilizada como alimento saudável e funcional em todo o mundo, com perspectivas de melhoras no estado nutricional e de saúde^{56,57}.

É uma resina complexa de origem vegetal-animal com uma composição altamente variável e atividades biológicas, que podem ser atribuídas à fonte botânica do pólen e às espécies de abelhas⁵⁸.

A composição do própolis é complexa e mais de 300 substâncias diferentes já foram identificadas. Suas características constitutivas podem variar de acordo com a espécie de abelha e época do ano em que é coletada⁵⁹. Em consequência da grande diversidade vegetal utilizada para a sua produção, identificou-se 12 tipos diferentes de própolis no Brasil. A mais conhecida e estudada é a própolis verde, produzida a partir de uma planta conhecida popularmente por alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*). Nas amostras brasileiras de própolis os compostos fenólicos, como o *artepillin C* e o ácido hidroxicinâmico, ácido cafeico são as principais substâncias⁵⁷.

Recentemente encontrou-se no nordeste brasileiro, região de manguezais um novo própolis, classificada como do tipo 13, denominada própolis vermelha sua principal origem botânica é a *Dalbergia ecastophyllum*. A própolis vermelha possui componentes (isoflavonas. Ainda não encontrados em nenhuma espécie de própolis brasileira: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4,7-dimethoxi-2'-isoflavona. Estes compostos podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante⁵⁹.

De acordo com Hendi, Naher e Al-Charrakh, o Brasil produz um dos melhores própolis do mundo devido ao clima tropical e subtropical e à diversidade de espécies fontes de resinas em suas florestas^{19,60}.

3.6 Própolis obesidade e microbiota intestinal

A barreira da mucosa intestinal consiste principalmente em células epiteliais intestinais (IECs) no lado luminal. Esta barreira permite o transporte

transcelular de nutrientes essenciais e controla a difusão de macromoléculas e bactérias luminal através da mucosa intestinal⁶¹. A disfunção ou destruição de das células de junção (TJ) é sempre acompanhada de ruptura da barreira da mucosa intestinal, levando à penetração de xenobióticos/ toxinas no lúmen, o que ativa o sistema imunológico intestinal⁵⁵.

Estudos relatam a relação existente entre a composição da microbiota do intestino e os efeitos adversos no hospedeiro, como inflamação e gordura corporal. Embora os mecanismos envolvidos nessas mudanças não tenham sido totalmente elucidados, pode ser caracterizada por um quadro de disbiose intestinal, principalmente pelo aumento de fatores de *phylum Firmicutes noexpense* de *Bacteriodete*. Esse cenário é acompanhado por concentrações aumentadas de lipopolissacarídeos bacterianos circulantes (LPS), remanescentes da parede celular e células completas que estimulam a resposta inflamatória⁵⁷. Esta condição, conhecida como endotoxemia metabólica, pode ser ampliada por uma maior permeabilidade das barreiras intestinais e disseminação de quilomicron⁶². O reconhecimento e a ligação do LPS pelo TLR4 estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias. As entidades microbianas possuem alta afinidade para os receptores semelhantes (TLR), que são expressas em várias células do sistema imune inato e vários outros tecidos, incluindo o músculo esquelético abundante, assim sinais de endotoxemia também são encontrados em indivíduos obesos, pois exibem maior expressão de TLR4 no músculo⁶³.

Dietas ricas em gordura podem modular a estrutura da microbiota intestinal, influenciar a permeabilidade intestinal e promover o transporte de LPS através do transporte de lipídios, uma vez que, os substratos administrados pela dieta afetam a composição da microbiota criando seletivamente alguns micróbios que posteriormente podem promover efeitos benéficos ou deletérios¹⁰.

O estudo de Roquette, mostrou que o consumo de uma dieta rica em gordura induz efetivamente os distúrbios bioquímico típicos do aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, principalmente disbiose intestinal, pela maior concentração de LPS circulante e aumento da expressão da via TLR4. Porém a ingestão de própolis é capaz de modular a microbiota intestinal em um

ponto próximo ao perfil normal, resultando na redução do LPS circulante e na resposta inflamatória, reduzindo a sobre expressão do TLR4⁵⁶.

É amplamente conhecido que a função de barreira intestinal intacta é extremamente importante para a manutenção de uma prevenção saudável de intestino e patógenos.

Em 2009, Koyamiyata et al, utilizaram própolis extraído em meio etanólico em camundongos alimentados com dieta *high-fat* contendo 50% de gordura durante 10 dias. A pesquisa 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 glicose⁶⁴.

Ichi et al. em 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 hepáticos⁶⁵.

Em 2010, um estudo investigou o efeito anti-obesidade do extrato etanol de própolis verde brasileira em camundongos, foi administrado duas vezes por semana uma injeção intraperitoneal com 100mg/kg de extrato de própolis, sendo possível avaliar que a suplementação com o extrato de própolis causou uma indução relativamente seletiva de leptina nos tecidos adiposos. Como a leptina é predominantemente expressa em adipócitos, o própolis pode induzir diretamente leptina em adipócitos em camundongos provocando a supressão da alimentação⁶⁶.

Em 2016, Nishikawa e colaboradores demonstraram que a artepilina C (ArtC), um componente típico da própolis brasileira induziu significativamente

a formação de adipócitos semelhantes com o marrom usando dois sistemas celulares (células C3H10T1 / 2 e adipócitos primários derivados de iWAT), conferindo a capacidade de aumentar a termogênese.

As atividades de adipócitos tipo marrom reduzem o acúmulo de gordura corporal por meio da indução de termogênese associada à UCP1 e resultam em redução do risco de doenças metabólicas. Essas descobertas indicam que uma nova estratégia de indução de adipócitos semelhantes a marrons em WAT pode ser uma das maneiras mais plausíveis de prevenir e tratar obesidade e diabetes.

Essas descobertas podem fornecer informações sobre o pardo de adipócitos brancos, incluindo o mecanismo molecular mediado por fatores alimentares, demonstrando que a ArtC possui uma nova função biológica no que diz respeito ao aumento do gasto energético pelo pardo de adipócitos brancos⁶⁷.

4. Conclusão

Em suma, verificou-se que a obesidade associada á microbiota intestinal e ao estado de inflamação crônica de baixa intensidade, está propensa ao desenvolvimento de várias doenças debilitantes, devido ao hipercrecimento de patógenos que conduz ao estado de inflamação. O uso de alimentos funcionais como a suplementação do extrato de própolis pode ser uma alternativa para tentar atenuar a obesidade e a disbiose intestinal através de suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, e antimicrobiana.

Apesar de existir um número considerável de estudos, faz-se necessárias novas pesquisa, as quais realizem estas associações, para que estas sejam usadas de forma segura em humanos.

Referências

1. Monteiro, PA. Efeito de diferentes modelos de exercícios físicos sobre a composição corporal, marcadores metabólicos e inflamatórios em adolescentes obesos. [tese]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2016.
2. Mantovani RM, Rocha NP, Magalhães DM, Barbosa IG, Teixeira AL, Simões e Silva AC. Early changes in adipokines from overweight to obesity in children and adolescents. *J Pediatr.* 2016;92(6):624-30.
3. Arraes, GCF, Funchal, C. Influência dos polifenóis do chá verde na obesidade. *Rev Nutr Bras.* 2017;16(1):43-56.
4. Chaves, AS. Estabelecimento de um modelo experimental de obesidade em camundongos para estudo da atividade farmacológica de fármacos sintéticos e naturais. [tese]. Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro; 2016.
5. Ochioni AC. Análises de Polimorfismos dos genes de mediadores inflamatórios envolvidos na obesidade. [dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro; 2016.
6. Pickens CA, Sordillo ML, Zhang C, Fenton J I. Obesity is positively associated with arachidonic acid-derived 5- and 11-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE). *Metab Clin Exp.* 2017; 70: 177-1791.
7. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):277-87.
8. Francisqueti, FV. Et al. O papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da síndrome metabólica. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2017;63(1):85-91.
9. Paschoal V, Naves A. Tratado de nutrição Esportiva Funcional. 1ed. Roca; São Paulo: 2014.
10. Moraes ACF, Silva IT, Pititto BA, Ferreira SRG. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética intestinal. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58(4):317-27.
11. Gonçalves JL, et al. Bases do sistema imunológico associado à mucosa intestinal. In book: *Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica*, p.369-388.
12. Tsukumo DM, Carvalho DM, Carvalho MA, Saad MJA. Pesquisa translacional em microbiota intestinal: novos horizontes no tratamento da obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53(2).
13. Spezia G, Silva LT, Santos SP, Liberali R, Navarro F. Microbiota intestinal e sua relação com a obesidade. *Rev Bras Obes Nutr Emagr.* 2009;3(15):260-72009.

14. Paixão LA, Castro FFS. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. *Rev Ciênc Saúde*. 2016;14(1):85-96.
15. Buttó LF, Haller D. Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence. *Int J Med Microbiol*. 2016;306(5):302-9.
16. Lima AR, Lacerda AA, Junqueira CS, Pimenta LM. Propriedades funcionais dos probióticos no tratamento da disbiose intestinal. [tese]. 2010.
17. Andrade VLA et al. Obesidade e microbiota intestinal. *Rev Med*. 2015;25(4):583-589.
18. Silva IRM et al. Microbiota intestinal na obesidade e homeostase energética. [tese]. Universidade Unigranrio, 2016.
19. Meneghelli C. Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico de própolis catarinense na formação de vasos sanguíneos. [tese]. Universidade de Santa Catarina: Florianópolis, 2015.
20. Tao Y, Wang D, Hu Y, Huang Y, Yu Y, Wang D. The Immunological Enhancement Activity of Propolis Flavonoids Liposome In Vitro an In Vivo. *Evid based complemente altern med*. 2014.
21. Zabaiou N et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Rev Chem Phys Lipids*. 2017.
22. Castro AM et al. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Rev Med Hosp Gen Méx*. 2017;80(2):101-105.
23. Francisqueti FV, Nascimento AF, Corrêa CR. Complicações da obesidade. *Rev Nutrire*. 2015;40(1):81-89.
24. Oliveira CMB et al. Citocinas e dor. *Rev. Bras. Anesthesiol*. 2011; 61(2).
25. Soares, NP. Efeitos da associação entre um dieta rica em carboidratos refinados e a hiperóxia sobre o desequilíbrio redox e a inflamação em camundongos. [tese]. Universidade Federal de Ouro Preto: Ouro Preto, 2015.
26. Fróes FCTS. Obesidade: um enfoque na inflamação periférica e central. [tese]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2012.
27. Sippel C, Bastian RMA, Giovanella J, Faccin C, Contini V, Bosco SM. Processos inflamatórios da obesidade. *Rev Atenção à Saúde*. 2014;12(42):48-56
28. Asghar A, Sheikh, N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Rev Cellular Immunology*. 2017;315:18-26.
29. Carswell EA et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(9):3666-70

30. Prins JB et al. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Rev Diabetes*. 1997;46(12):1939-44.
31. Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Damaso AR. Obesidade e adipocinas inflamatória: Implicações práticas para a prescrição de exercício. *Rev Bras Med Esporte*. 2009;15(5):378-83.
32. Cinkajzlová A, Mráz M, Haluzík M. Lymphocytes and macrophages in adipose tissue in obesity: markers or makers of subclinical inflammation? *Rev Protoplasma* May 2017;254(3):1219–1232.
33. Yang I et al. Quercetin Protects Obesity-Induced Hypothalamic Inflammation by Reducing Microglia-Mediated Inflammatory Responses via HO-1 Induction. *Rev Nutrients*. 2017;9(7):650.
34. Telega G. Microbioma intestinal na obesidade. Ebook.ecogobesity.eu/pt/biologia/microbiomaintestinalobesidade,2015.
35. Takikawa M, Kumagai A, Hirata H, Soga M, Yamashita Y, Ueda M, et al. 10 Hydroxy-2-decenoic acid, a unique medium-chain fatty acid, activates 5'-AMP-activated protein kinase in L6 myotubes and mice. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57:1794-802.
36. Larsen N et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from on-diabetic adults. *Plos One*. 2010;5(2):85-90
37. Koeth RA et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*. 2013;19(5):576-585
38. Lopez-Legarrea P. et al. The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets and gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2014;23(23):360-8
39. Qin J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Rev Nature*. 2010;464:59-65
40. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. 2013;34(1):39-58.
41. Teixeira LG. Interação entre obesidade induzida por dieta hiperlipídica e colite crônica aumenta reciprocamente a inflamação no tecido adiposo e no cólon. [tese]. Universidade Federal de Minas Gerais: Belo Horizonte, 2012.

42. Lee CY. The effect of high-fat-induced pathophysiological changes in the gut on obesity: What should be the ideal treatment?. *Clinic Transl Gastroenterol.* 2013;4.
43. Mittestainer RK. Efeito dos antipsicóticos olanzapina e clozapina nos parâmetros metabólicos e na microbiota intestinal. [tese]. Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 2016.
44. Cesar DF. Microbiota intestinal relacionada à obesidade. [tese]. Universidade Católica De Brasília: Brasília, 2015.
45. Pinto PSMR. Efeito metabólico da dieta e dos probióticos, na microbiota intestinal, na prevenção do Câncer do Colo-Rectal. [tese]. Universidade de Porto: Porto, 2017.
46. Nistal E, Fernandez-Fernandez N, Vivas S, Olcoz JL. Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota. *Front Oncology.* 2015;5:220.
47. Zhang YJ et al. "Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases." *International Journal of Molecular Sciences.* v. 16, n.4: 7493–7519, 2015.
48. Silva MRI et al., Microbiota intestinal na obesidade e homeostase energética. *Rev Almanaque multid Pesq.* Universidade Unigranrio, 2016.
49. Bull M, Plummer N. The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integrative Medicine.* 2014;13(6)17–22.
50. Shreiner A, Kao J, Young GV. The Gut Microbiome in Health and in Disease. *Nat Inst Health.* 2016;31(1):69–75
51. Vieira CR. Efeito de uma bebida funcional à base de farinha de banana verde sobre a microbiota intestinal, níveis de citocinas e capacidade antioxidante em mulheres com excesso de peso e adiposidade abdominal. [tese]. Universidade Federal de Alfenas: Alfenas, 2016.
52. Yuksel S, Akyol S. The consumption of propolis and royal jelly in preventing upper respiratory tract infections and as dietary supplementation in children. *J Intercult Ethnophar* 2016;5(3):2016.
53. Saeed, F. Propolis to Curb Lifestyle Related Disorders: An Overview. *International J Food Properties.* 2016;19:420–437.
54. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules.* 2014;19:19610–19632.
55. Wang K et al. Polyphenol-Rich Propolis Extracts Strengthen Intestinal Barrier Function by Activating AMPK and ERK Signaling. *Rev Nutrients.* 2016;8(272).
56. Rochetto RA. Green propolis modulates gut microbiota, reduces endotoxemia and expression of TLR4 pathway in mice fed a high-fat diet. *Food Res Int.* 2015;76(3):796-803.
57. Souza EA. Própolis na dieta de abelhas *Apis mellifera* L. E seu efeito no sistema imune, expressão de genes após o desafio bacteriano e detoxificação frente ao agroquímico Fipronil. [tese] Universidade Estadual Paulista: Botucatu, 2016.
58. Fischer G et al. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Biol.* 2008;75(2):247-253.

59. Endo MM. Efeito Antibacteriano de Extrato de Própolis Vermelha e Verde em Canais Radiculares Infectados por *Enterococcus faecalis*. [tese]. Universidade Federal de Goiás: Goiânia, 2015.
60. Hendi NKK, Naher HS, Al-charrak AH. Iraqi propolis: the antimicrobial activities. *J. Medicin Plants Res.* 2011.
61. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:141–153.
62. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One.* 2012;7(10).
63. Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci, F, Gigante G, Ianiro G, et al. The role of intestinal microbiota and the immune system. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol, 17, nº (3), p.323–333, 2013.
64. Koya-Miyata S, Arai N, Mizote A, Taniguchi Y, Ushio S, et al. Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:2022-2028.
65. Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, et al. The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a highfat diet. *J Food Sci.* 2009;74:127-131.
66. Washio K, Shimamoto Y, Kitamura H. Brazilian propolis extract increases leptin expression in mouse adipocytes. *Biomedical Research (Tokyo)*, 2015;36 (5):343-346.
67. Nishikawa S et al. Artepillin C, a Typical Brazilian Propolis Derived Component, Induces Brown-Like Adipocyte Formation in C3H10T1/2 Cells, Primary Inguinal White Adipose Tissue Derived Adipocytes, and Mice. *PLoS One.* 2016;6:11-19.

Normas da revista Metabolism, clinical and experimental

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering:

Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

