

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS BALB/c
SUBMETIDOS A ESTRESSE CRÔNICO**

FABIANE MISSIMA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS BALB/c
SUBMETIDOS A ESTRESSE CRÔNICO**

FABIANE MISSIMA
Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU – SP
Fevereiro – 2005

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	1
CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
Referências Bibliográficas	6
CAPÍTULO 2	8
EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS BALB/c SUBMETIDOS A ESTRESSE CRÔNICO	9
Resumo	9
Summary	10
Introdução	11
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	16
Referências Bibliográficas	27
CAPÍTULO 3	30
IMPLICAÇÕES	31

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosa e Roberto e minha irmã Juliana, pelo imenso amor, compreensão, força e confiança. Meus eternos exemplos.

Ao meu namorado Nelson, pelo carinho, compreensão e companheirismo.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Maurício Sforcin pela orientação na elaboração dessa dissertação e contribuição na minha formação profissional, pela compreensão, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não seria possível sem a participação e apoio de diversas pessoas, dentre as quais agradeço em especial:

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, pela disponibilidade, auxílio e paciência na realização das análises histológicas;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelos ensinamentos;

Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelo agradável convívio e importantes sugestões;

À Profa. Dra. Eunice Oba e Profa. Dra. Lucy Marie Ribeiro Muniz, pelo auxílio na dosagem de corticosterona;

Ao Prof. Dr. Edson Ramos de Siqueira e Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante, por terem participado gentilmente do Exame Geral de Qualificação;

À Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera e Prof. Dr. Cláudio Ângelo Agostinho, pela amizade e constante incentivo nos caminhos da pesquisa. Minha grande admiração pessoal e profissional;

Aos funcionários Luiz Alquati, Maria Lourdes Alves e Luis Severino da Silva, pelo convívio e colaboração nas diversas fases da realização deste trabalho;

Aos meus amigos Ricardo de Oliveira Orsi e Gladston Alves Nunes, pelo auxílio nos experimentos, amizade e constante apoio;

Aos Pós-Graduandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, bem como da Zootecnia, pelo auxílio, amizade e momentos de descontração;

Às secretárias Leonice Garcia e Sônia Maria Faraldo do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelo auxílio, paciência e amizade;

Às secretárias Carmen Silvia de Oliveira Pólo e Seila Cristina Cassinelli Vieira, do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pelo auxílio e disponibilidade;

Aos meus familiares e amigos, pelo constante incentivo nessa caminhada;

Às minhas amigas especiais Luciana Mimesse, Fabíola Quirino Ungarelli, Tânia Delfino Azevedo, Andréia Aparecida Shimofusa e Mara Lúcia de Azevedo, pelo grande apoio e incentivo nos momentos mais difíceis. Amigas sempre presentes, apesar da distância que nos separa;

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

“O importante não é chegar: é ir...”

(Charles Chaplin)

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O conceito de estresse foi apresentado pelo pesquisador canadense de origem francesa Hans Selye em 1936, tendo havido, posteriormente, um crescente interesse dos pesquisadores quanto à identificação dos agentes estressores bem como dos eventos fisiológicos envolvidos na resposta ao estresse.

O estresse é comumente definido como uma condição ou estado em que a homeostase do organismo é perturbada, como resultado de estímulos estressores. O estresse é uma constelação de eventos, envolvendo a participação de diferentes sistemas do organismo em resposta a agentes estressores, como fatores climáticos, hiperpopulação, infecções, exercício físico intenso, desnutrição, ruído, odor, entre muitos outros (KIOUKIA-FOUGIA *et al.*, 2002).

O estresse é uma resposta adaptativa fundamental à sobrevivência, presente não só em mamíferos, mas também em outros vertebrados. Os mecanismos básicos e moléculas envolvidas na resposta ao estresse são similares e bem preservados ao longo da evolução das espécies (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996).

A resposta ao estresse envolve a ativação do sistema nervoso autônomo, bem como a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com conseqüente aumento de catecolaminas e glicocorticóides, respectivamente. O estresse origina impulsos nervosos, que são transmitidos desde a periferia até o hipotálamo. O hipotálamo, então, secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o qual induz a secreção de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na hipófise anterior. O ACTH flui pelo sangue até o córtex da adrenal, induzindo a secreção de glicocorticóides, como cortisol, corticosterona e aldosterona (SELYE, 1978).

Quanto às perturbações resultantes do estresse, a rápida alteração no nível de catecolaminas e corticosteróides é uma resposta adaptativa, capacitando o organismo a responder à condição estressante, havendo mobilização das reservas de energia, aumento da freqüência cardíaca e

respiratória, sudorese, dentre outros eventos, que culminam em inibição da resposta imune (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996).

O estresse agudo pode ser entendido como uma ameaça imediata, a curto prazo, comumente conhecido como resposta à luta ou fuga (DHABHAR, 2002). Por outro lado, o estresse é denominado crônico quando persiste por várias horas a dias, semanas ou meses (BAUER *et al.*, 2000).

Muitas evidências têm sugerido que o estresse modula a resposta imune (BESEDOVSKY & DEL REY, 1996). A Imunoneuroendocrinologia ou Psiconeuroimunologia tem despertado a atenção dos pesquisadores quanto ao estudo da relação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino, os quais compartilham receptores para citocinas, neurotransmissores e hormônios.

DHABHAR (2002) sugeriu que o estresse agudo pode estimular as funções imunes. Durante os primeiros minutos após o estresse agudo, o número de leucócitos aumenta, mas, persistindo o estímulo estressor, começa a diminuir e assim permanece. Essa diminuição é devida à redistribuição de leucócitos e imunovigilância em locais por onde as células passam durante o estresse, e não por destruição das mesmas. Cessado o estresse, o número de leucócitos retorna ao nível basal pré-estresse, dentro de poucas horas.

Por outro lado, o estresse crônico pode induzir imunossupressão. Hormônios envolvidos na resposta ao estresse, como os glicocorticóides, são considerados imunossupressores, sendo clinicamente utilizados como agente antiinflamatório. No estresse crônico, observa-se inibição na síntese de prostaglandinas, na produção de citocinas e proliferação de linfócitos (DHABHAR, 2002).

Segundo SAKAI (1999), os imunoestimulantes poderiam promover uma recuperação do estado de imunossupressão induzida pelo estresse. Há diferentes tipos de imunomoduladores, incluindo agentes químicos, bacterianos, polissacarídeos, extratos de animais ou plantas, fatores nutricionais e citocinas.

A própolis é um produto natural, elaborado pelas abelhas a partir de material coletado em botões, gemas e córtex vegetais, tendo sido

empiricamente utilizada por apresentar inúmeras propriedades biológicas, dentre elas, a imunomoduladora.

A própolis é um conjunto complexo de substâncias, apresentando, de forma genérica, em sua composição química *in natura* 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (THOMSON, 1990).

Atualmente, a própolis tem despertado a atenção de pesquisadores, interessados em elucidar cientificamente suas propriedades (BANSKOTA *et al.*, 2001).

A ação antibiótica da própolis tem sido estudada, evidenciando-se sua ação antibacteriana (SFORCIN *et al.*, 2000), antiviral (TATEFUJI *et al.*, 1993), antifúngica (SFORCIN *et al.*, 2001) e antiparasitária (FREITAS *et al.*, no prelo).

Com relação ao sistema imune e seus mecanismos efetores, trabalhos experimentais de nosso laboratório revelaram que a própolis induz elevação na geração de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos e inibição na liberação de NO por estas células, de forma dose-dependente (ORSI *et al.*, 2000). Evidenciamos também que macrófagos estimulados com própolis apresentaram aumento na atividade fungicida contra *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD *et al.*, 2002) e na atividade bactericida contra *Salmonella Typhimurium* (ORSI *et al.*, 2005), havendo também maior produção de anticorpos anti-BSA em ratos tratados com este apiterápico (SFORCIN *et al.*, no prelo).

Com base nas observações expostas, o objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar a ação da própolis na resposta imune de camundongos BALB/c submetidos a estresse crônico. Considerando a grande quantidade de fenômenos estressores, quer na natureza, quer na vida do homem moderno, alternativas como a utilização de produtos naturais com comprovada ação imunomoduladora poderiam reverter os efeitos imunossupressores do estresse.

Como exigências do curso de Pós-Graduação em Zootecnia, esta dissertação encontra-se apresentada em um capítulo, na forma em que será submetida à publicação:

- Capítulo 2: **Efeito da própolis sobre parâmetros imunológicos de camundongos BALB/c submetidos a estresse crônico.** O presente trabalho será submetido à revista **Phytomedicine**, de acordo com suas normas para publicação.

O capítulo 3 diz respeito às implicações decorrentes da realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- BANSKOTA, A.H., TEZUKA, V., KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 561-71, 2001.
- BAUER, M. E., VEDHARA, K., PERKS, P., WILCOCK, G. K., LIGHTMAN, S. L., SHANKS, N. Chronic stress in caregivers of dementia is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. **J. Neuroimmunol.**, v. 103, p. 84-92, 2000.
- BESEDOVSKY, H. O., DEL REY, A. Immune-endocrine interactions: Facts and hypotheses. **Endocr. Rev.**, v. 17, p. 64-102, 1996.
- DHABHAR, F.S. Stress-induced augmentation of immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, p. 785-98, 2002.
- FREITAS, S.F., SHINOHARA, L., SFORCIN, J.M., GUIMARÃES, S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. Aceito para publicação junto à revista **Phytomedicine (no prelo)**.
- KIOUKIA-FOUGIA, N., ANTONIOU, K., BEKRIS, S., LIAPI, C., CHRISTOFIDIS, I., PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 823-30, 2002.
- MURAD, J.M., CALVI, S.A., SOARES, A.M.V.C., BANKOVA, V., SFORCIN, J.M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 331-34, 2002.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Editora UNESP. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994, v.2: Referências bibliográficas.

BIOSIS. Serial Sources for the BIOSIS' previews data base. Philadelphia, 1991. 451p.

- 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. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 6, n. 2, p. 205-19, 2000.
- ORSI, R.O., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C., BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella* Typhimurium. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 359-68, 2005.
- OTTAVIANI, E. FRANCESCHI, C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. **Progress in Neurobiology**, v. 48, p. 421-40, 1996.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SELYE, H. **The stress of life**. McGraw-Hill Book Co.: New York, 1978.
- SFORCIN, J. M., FERNANDES JÚNIOR, A., LOPES, C. A. M., BANKOVA, V., FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 243-49, 2000.
- SFORCIN, J. M., FERNANDES JÚNIOR, A., LOPES, C. A. M., FUNARI, S. R. C., BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 7, p. 139-44, 2001.
- SFORCIN, J.M., ORSI, R.O., BANKOVA, V. Effects of propolis, some isolated compounds and Baccharis extracts on antibody production. Geographic origin and seasonal effects on propolis activity. Aceito para publicação junto à revista **J. Ethnopharmacol. (no prelo)**.
- TATEFUJI, T., YAMAUCHI, H., IKEDA, M., ANDO, S., KURIMOTO, M. Effect of propolis obtained in Brazil on infectivity of viruses. **Shoyakugaku Zasshi**, v.47, p.60-4, 1993.
- THOMSON, W. Propolis. **Med. J. Aust.**, v. 153, p.654, 1990.

CAPÍTULO 2

“Efeito da própolis sobre parâmetros imunológicos de camundongos BALB/c submetidos a estresse crônico”.

Resumo

A relação entre estresse e imunidade tem sido amplamente investigada, envolvendo o sistema neuroendócrino e vários outros órgãos. A natureza fisiológica do estresse, a grande diversidade de condições estressantes e sua complexa relação com o sistema imune e doenças têm recebido especial atenção. A própolis tem sido motivo de intensa investigação científica e sua ação imunomoduladora vem sendo mencionada. O objetivo deste projeto foi avaliar a ação imunomoduladora da própolis em camundongos BALB/c submetidos a estresse por imobilização, através da análise morfológica do timo, baço, medula óssea e adrenal, avaliação do estado de ativação de macrófagos e indicadores de estresse (glicose e corticosterona). Animais estressados apresentaram produção mais elevada de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, quando tratados com própolis, apresentaram potencialização na geração de H_2O_2 e inibição na liberação de óxido nítrico (NO). A análise histológica revelou aumento no número de centros germinativos no baço de animais estressados. Não foram observadas alterações no timo, medula óssea e adrenal dos animais estressados ou tratados com própolis. O tratamento com própolis impediu o aparecimento de alterações encontradas no baço de animais submetidos a estresse. Futuras investigações fornecerão maiores contribuições quanto à possibilidade de utilização da própolis durante o estresse.

Palavras-chave: estresse, própolis, macrófagos, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, órgãos linfóides.

“Propolis effect on immunological parameters of chronically stressed-mice”.

Summary

Stress is a generic term that summarizes the effects of psychosocial and environmental factors on physical and mental well-being. The interaction between stress and immunity has been widely investigated, involving the neuroendocrine system and several organs. Assays using natural products in stress models deserve further investigation. Propolis immunomodulatory action has been mentioned and it has been the reason of scientific investigation in our laboratory. The aim of this study was to evaluate propolis effect on macrophage activation in BALB/c mice submitted to immobilization stress, as well as the histopathological analysis of the thymus, bone marrow, spleen and adrenal glands. Stressed mice showed a higher hydrogen peroxide (H₂O₂) generation, and propolis treatment potentiated H₂O₂ generation and inhibited nitric oxide (NO) production. Histopathological analysis showed no alterations in the thymus, bone marrow and adrenal glands, but increased germinative centers in the spleen. Propolis treatment counteracted the alterations found in the spleen of stressed mice. Further investigation will provide a better comprehension of propolis immunomodulatory action during stress.

Key-words: stress, propolis, macrophages, hydrogen peroxide, nitric oxide, lymphoid organs.

Introdução

O estresse é comumente definido como uma condição ou estado em que a homeostase do organismo é perturbada, como resultado de estímulos estressores como fatores climáticos, hiperpopulação, infecções, exercício físico intenso, desnutrição, ruído, odor, entre muitos outros, envolvendo a participação de diferentes sistemas do organismo (KIOUKIA-FOUGIA *et al.*, 2002).

A resposta ao estresse envolve a ativação do sistema nervoso autônomo, bem como a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com conseqüente aumento de catecolaminas e glicocorticóides, respectivamente (SELYE, 1978).

O estresse agudo pode ser entendido como uma ameaça imediata, a curto prazo, comumente conhecido como resposta à luta ou fuga, e, após o evento, que dura minutos a horas, há uma resposta de relaxamento (DHABHAR, 2002). Por outro lado, o estresse é denominado crônico quando persiste por várias horas a dias, semanas ou meses (BAUER *et al.*, 2000).

O estresse crônico pode induzir imunossupressão. Hormônios envolvidos na resposta ao estresse, como os glicocorticóides, são considerados imunossupressores, inibindo a produção de citocinas e proliferação de linfócitos. A produção de IL-3, uma das citocinas fundamentais para hematopoese, encontra-se inibida em resposta ao estresse e em indivíduos com depressão, sugerindo a interligação entre sistema nervoso e sistema imune (BESSLER *et al.*, 2000). DOMÍNGUEZ-GERPE & REY-MÉNDEZ (2001) relataram alterações em subpopulações de linfócitos após estresse crônico por imobilização, demonstrando que células T foram mais afetadas que células B.

O cortisol ocasiona diversos efeitos imunossupressores, como diminuição na produção de anticorpos, supressão da proliferação de linfócitos, redução da produção e ação de diversos mediadores celulares, como citocinas, e diminuição da atividade macrófágica (REDDY & LEATHERLAND, 1998).

A própolis é um produto natural, elaborado pelas abelhas a partir de material coletado em botões, gemas e córtex vegetais, tendo sido empiricamente utilizada por apresentar inúmeras propriedades biológicas, dentre elas, a imunomoduladora.

Atualmente, a própolis tem despertado a atenção de pesquisadores, interessados em elucidar cientificamente suas propriedades (BANSKOTA *et al.*, 2001).

Com relação ao sistema imune e seus mecanismos efetores, trabalhos experimentais de nosso laboratório revelaram que macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com própolis apresentaram aumento na atividade fungicida contra *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD *et al.*, 2002) e na atividade bactericida contra *Salmonella Typhimurium* (ORSI *et al.*, 2005). Evidenciamos que a própolis induz elevação na geração de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos e inibição na liberação de NO por estas células, de forma dose-dependente (ORSI *et al.*, 2000), bem como estimula maior formação de anticorpos em ratos (SFORCIN *et al.*, no prelo) e aumenta a atividade lítica de células *natural killer* contra células tumorais (SFORCIN *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento com própolis poderia reverter os efeitos induzidos pelo estresse sobre o estado de ativação de macrófagos, através da determinação de H₂O₂ e NO. Foram avaliadas alterações morfológicas no timo, medula óssea, baço e adrenal dos animais e determinamos a concentração sérica de glicose e corticosterona dos animais.

Material e Métodos

Obtenção da própolis

A coleta de própolis foi realizada no Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, localizado na Fazenda Experimental Lageado.

Foram utilizadas colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*, Linneaus, 1758), alojadas em colméias de madeira modelo Langstroth. Telas

propolisadoras foram colocadas sobre o último componente das caixas de madeira e sob a tampa da colméia. Ao final do mês, as telas foram retiradas, colocadas em freezer, e, decorridas 24 horas, as telas foram desenroladas e esfregadas para liberação da própolis (TOTH, 1985).

A própolis foi triturada e, em seguida, uma solução em álcool 70% foi preparada a 30% (30 g de própolis, completando o volume para 100 mL com álcool 70%) e deixada ao abrigo da luz, sob agitação freqüente, durante 7 dias (SFORCIN *et al.*, 2002). Em experimentos-piloto, foi calculado o peso seco do extrato de própolis e determinada a concentração final de própolis (mg/mL), para calcular a concentração de própolis a ser administrada aos animais.

Animais e indução do estresse

Este projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu.

Foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c, com peso médio de 15-20 g e aproximadamente 35 dias de idade, mantidos no Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNESP, Campus de Botucatu.

Os animais foram divididos em 4 grupos (G1, G2, G3 e G4) de 6 animais. O grupo G1 foi considerado controle. O grupo G2 foi submetido a estresse por imobilização em tubo PVC (12 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, com capacidade ~ 50 mL), aerado, por 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 minutos, durante 7 dias consecutivos, às 8:00 h da manhã (DOMÍNGUEZ-GERPE & REY-MÉNDEZ, 2001).

G3 recebeu somente solução hidroalcoólica de própolis (200 mg/kg) por via oral, durante 7 dias. G4 foi submetido a estresse e tratado diariamente com própolis, seguindo o mesmo protocolo.

Durante o estresse, os grupos ficaram sem água e ração. Após 24 horas dos respectivos tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Avaliação dos níveis séricos de glicose e corticosterona

Antes do sacrifício dos animais, o sangue foi coletado do plexo retro-orbital e, para avaliação de indicadores do estabelecimento do estresse, o sangue foi utilizado imediatamente para determinação da concentração de glicose (Accutrend®). O soro foi congelado a -20° C e a corticosterona foi determinada por radioimunoensaio, utilizando kits comerciais (Coat-A-count®).

Avaliação do estado de ativação de macrófagos

Macrófagos peritoneais de camundongos foram obtidos após a injeção de 3 a 5 mL de PBS gelado na cavidade abdominal. Após massagear o abdomen levemente por 30 segundos, o líquido peritoneal foi coletado e colocado em tubo plástico Falcon. Este procedimento foi repetido 3 a 4 vezes e, em seguida, os tubos foram centrifugados a $200 \times g$, por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio completo para cultura de células (meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES), e a concentração celular ajustada para 2×10^6 células/mL. 100 μ L destas suspensões foram distribuídos em placas de microcultura, com posterior incubação a 37° C em tensão de 5% de CO_2 . Após 2 horas, as células não-aderentes foram removidas, e os macrófagos aderidos foram incubados novamente, a 37° C por 24 horas.

Determinação da produção de reativos intermediários do oxigênio (H_2O_2)

A produção de H_2O_2 por macrófagos foi determinada através da microtécnica de oxidação do vermelho fenol (PICK & MIZEL, 1981).

Os sobrenadantes das culturas foram coletados para a determinação da produção de óxido nítrico e as células utilizadas para a determinação de H_2O_2 . As células foram ressuspensas ao volume original em solução de vermelho fenol, contendo 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de

potássio pH 7,0; 5,5 mM de dextrose de raiz forte tipo II (0,01 mg/mL). A reação foi interrompida após 1 hora, pela adição de 10 μ L de NaOH 1N. As amostras foram efetuadas em triplicatas.

A absorbância foi determinada em microleitor de ELISA automático, com filtro de 620 nm, sendo o branco constituído de solução de vermelho fenol e NaOH. Os resultados foram expressos em nmoles de H_2O_2 / 2×10^5 células, a partir da curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho fenol.

Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio (NO)

O óxido nítrico decompõe-se, em meio de cultura, em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-). A produção de NO_2^- por macrófagos foi determinada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1981), combinando 100 μ L do sobrenadante da amostra teste com 100 μ L do reagente de Griess (Need 0,1% e sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5%), por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram lidas em leitor de ELISA, em 540 nm. Os resultados foram expressos em μ moles de NO / 2×10^5 células, comparando-se a densidade óptica com a curva padrão de NO_2^- , realizada junto com o experimento.

Processamento e Análise Histológica

Imediatamente após o sacrifício, o baço, timo, fêmur e adrenais de todos os animais foram retirados. Este material foi recortado e fixado em formalina tamponada a 10% durante 48 h, e posteriormente incluído em parafina e corado com hematoxilina e eosina (HE). Cortes de 5 μ m de espessura foram desparafinizados e hidratados seqüencialmente em xilol, álcool etílico absoluto, álcool etílico 90%, álcool etílico 70% e água destilada. Em seguida, as lâminas foram incubadas com hematoxilina por 3 minutos e, posteriormente em eosina por 2 minutos. As lâminas coradas foram

desidratadas em banhos de álcool etílico a 95%, álcool etílico absoluto e xilol, seqüencialmente, para posterior montagem das lâminas em Permount.

Alterações histológicas nos órgãos linfóides foram avaliadas segundo critérios estabelecidos por KUPER *et al.* (2000) e nas adrenais por JONES *et al.* (1996). Os dados da análise histopatológica foram apresentados com relação ao tipo de alteração encontrada e sua freqüência nos órgãos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Foi analisada a relação córtex/medula no timo e adrenais, e a prevalência de centros germinativos na polpa branca do baço.

Análise estatística

Os procedimentos estatísticos foram realizados, empregando-se o programa Graph Pad Software, San Diego, CA, USA, 1993 (GODFREY, 1985). Diferenças significativas entre os diversos tratamentos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Para análise da concentração de glicose e corticosterona, foi utilizado o teste *t* de Student.

Resultados e discussão

Considerando que a glicemia tem sido utilizada como indicador de estresse, a concentração sérica de glicose foi determinada após indução do estresse por imobilização. Este procedimento é de fácil realização e não provoca dor física nos animais (DOMÍNGUEZ-GERPE & REY-MÉNDEZ, 2001). Conforme observado na tabela 1 e figura 1, animais estressados apresentaram valores glicêmicos superiores ao grupo controle, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Trabalhos experimentais de KIOUKIA-FOUGIA *et al.* (2002) também não evidenciaram aumento na glicemia de animais submetidos a três modelos diferentes de estresse. Este fato pode ser explicado em virtude de o nível de glicose

umentar rapidamente após o estresse agudo, e nem sempre manter-se elevado após longo período de indução de estresse.

A ativação do eixo HPA tem um papel importante nas respostas comportamentais e imunológicas observadas normalmente durante o estresse. Entretanto, não houve diferença quanto à concentração sérica de corticosterona, embora tenha sido mais elevada em animais estressados ($p > 0,05$) (tabela 1; figura 1). AZPIROZ et al. (1999) também não encontraram diferenças quanto à concentração de corticosterona em camundongos estressados cronicamente, sugerindo uma resposta adaptativa do eixo HPA na presença prolongada de altas concentrações de glicocorticóides.

Tabela 1. Concentração sérica de glicose (mg/dL) e corticosterona (ng/mL) em camundongos submetidos a estresse.

	Controle	Estresse
Glicose	171,00 (17,56)	190,33 (26,41)
Corticosterona	127,25 (56,48)	147,76 (36,24)

Resultados representam a média \pm desvio-padrão da média (s) de 6 animais.

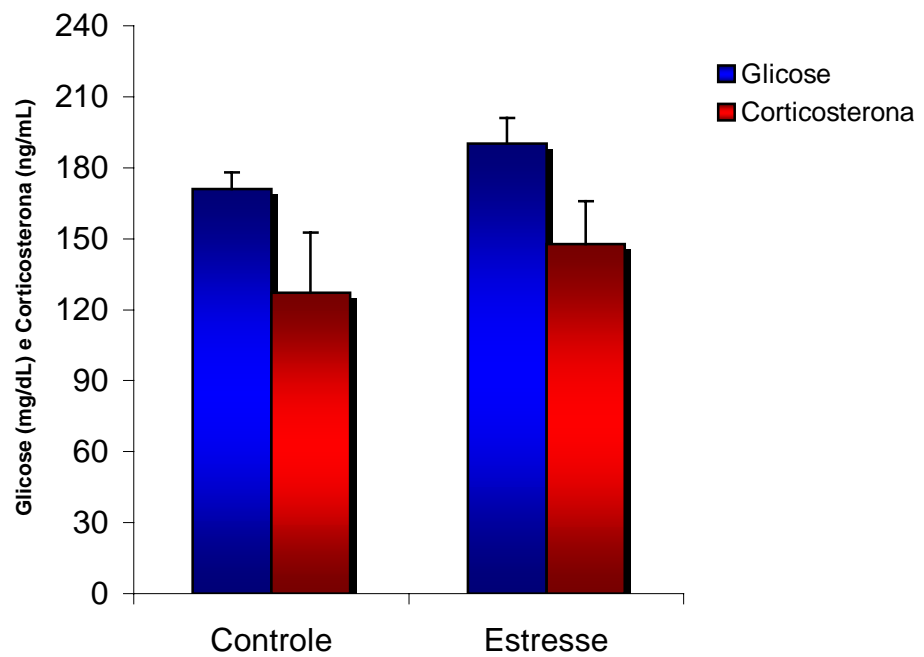


Figura 1. Concentração sérica de glicose (mg/dL) e corticosterona (ng/mL) em camundongos submetidos a estresse. Resultados representam a média \pm desvio-padrão da média (s) de 6 animais.

Segundo SAKAI (1999), os imunoestimulantes poderiam promover uma recuperação do estado de imunossupressão induzida pelo estresse. WAZIÈRES *et al.* (1998), avaliando o potencial do imunomodulador RU41470, verificaram que este neutralizou os efeitos do estresse por ruído em camundongos de idade avançada. Reativos intermediários do oxigênio e citocinas pró-inflamatórias apresentaram-se elevados após estresse, mas retornaram aos valores normais após tratamento com este imunomodulador. WAKIKAWA *et al.* (1999) observaram que a administração de vitamina E foi efetiva na resposta imune de camundongos jovens submetidos a estresse. Tal efeito não foi observado em camundongos velhos.

A ação imunomoduladora da própolis vem sendo amplamente pesquisada em nosso laboratório (ORSI *et al.*, 2000; MURAD *et al.*, 2002; SFORCIN *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2003; SÁ-NUNES *et al.*, 2003; ORSI *et al.*, 2005; SFORCIN *et al.*, no prelo). Considerando que a relação estresse-imunidade tem sido motivo de intensa investigação científica nos últimos anos, a possível utilização da própolis em animais estressados foi o objetivo deste trabalho.

Conforme observado na tabela 2 e figura 2, a produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos estressados foi superior ao controle, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Animais tratados somente com própolis apresentaram elevação na produção deste metabólito, o que está de acordo com resultados prévios de nosso laboratório (ORSI *et al.*, 2000). Camundongos estressados e tratados com própolis apresentaram potencialização na produção de H₂O₂ ($p < 0,05$).

A geração de intermediários reativos do oxigênio está relacionada a mecanismos microbicidas de células envolvidas na resposta imune (MOONIS *et al.*, 1992). A própolis, aumentando a geração destes metabólitos, pode ser considerada um importante produto natural imunomodulador, estimulando o estado de ativação de macrófagos, conforme observado em nossos resultados.

PALERMO-NETO *et al.* (2001), avaliando camundongos submetidos a estresse por choque diário nas patas durante 6 dias, observaram aumento na liberação de H₂O₂ por estes animais.

Tabela 2. Produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse e tratados com própolis.

Controle	Estresse	Própolis	Própolis + Estresse
0,29	0,38 #	0,46 *	0,55 *
(0,03)	(0,10)	(0,06)	(0,08)

Resultados expressos em nmoles de H₂O₂ / 2 x 10⁵ células e representam a média ± desvio-padrão (s) de 6 animais (n de experimentos = 3).

* significativamente diferente do controle (p<0,05)

significativamente diferente de Própolis + estresse (p<0,05)

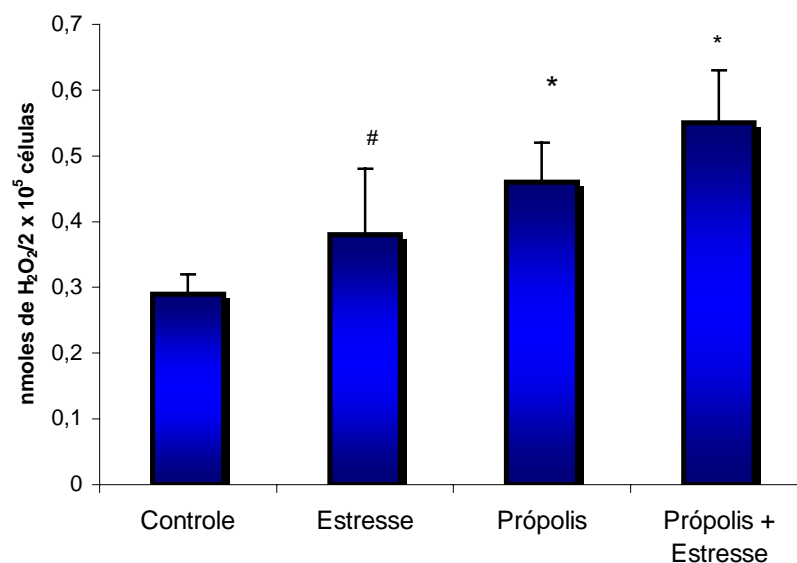


Figura 2. Produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse e tratados com própolis.

* significativamente diferente do controle (p<0,05)

significativamente diferente de Própolis + estresse (p<0,05)

A produção de intermediários reativos do nitrogênio está relacionada à ação citotóxica de macrófagos, visto que o óxido nítrico inibe enzimas mitocondriais relacionadas à respiração celular.

Quanto à produção de NO, animais estressados apresentaram leve diminuição de liberação deste metabólito em relação ao controle ($p > 0,05$) (tabela 3; figura 3). Similarmente, PALERMO-NETO *et al.* (2001), avaliando as consequências do estresse materno durante a prenhez na resposta imunológica dos filhotes, não verificaram alteração na produção de óxido nítrico. Estes mesmos autores observaram decréscimo no espriamento e no índice de fagocitose de macrófagos.

Animais tratados apenas com própolis apresentaram significativa diminuição na produção de NO. Da mesma forma, animais submetidos a estresse e tratados com própolis diariamente apresentaram inibição na produção de NO. Trabalhos anteriores de nosso laboratório evidenciaram que a própolis inibe a geração de NO por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (ORSI *et al.*, 2000).

Embora tenham sido determinadas as concentrações de H_2O_2 e NO por macrófagos peritoneais de camundongos, não se pode excluir a possibilidade de influência do estresse em outros mecanismos microbicidas.

Tabela 3. Produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse e tratados com própolis.

Controle	Estresse	Própolis	Própolis + Estresse
21,04	19,47 [#]	12,94 [*]	11,36 [*]
(1,18)	(1,77)	(3,04)	(5,07)

Resultados expressos em $\mu\text{moles de NO} / 2 \times 10^5$ células e representam a média \pm desvio-padrão (s) de 6 animais (n de experimentos = 3).

* significativamente diferente do controle ($p < 0,01$)

[#] significativamente diferente da própolis e da própolis + estresse ($p < 0,01$)

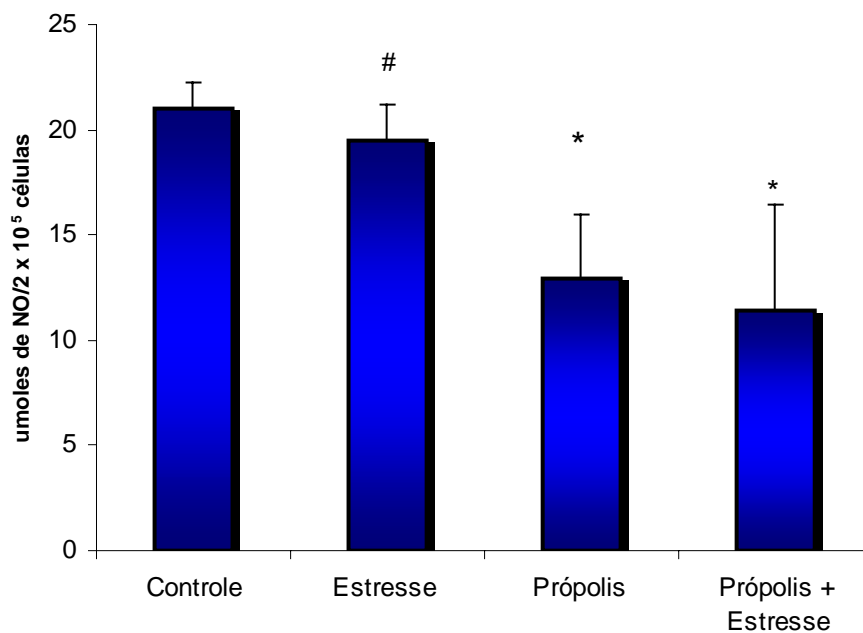


Figura 3. Produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse e tratados com própolis.

* significativamente diferente do controle ($p < 0,01$)

[#] significativamente diferente da própolis e da própolis + estresse ($p < 0,01$)

Tem sido sugerido que a supressão das funções imunes induzidas pelo estresse seria uma resposta adaptativa ao longo da evolução, na tentativa de conservação de energia, a qual seria requerida para demandas imediatas impostas pelo agente estressor (DHABHAR, 2002).

SELYE (1978) relatou que animais estressados apresentam a “tríade morfológica”, referindo-se a alterações que ocorrem no timo, linfonodos e baço de animais submetidos a estresse, como adaptação ao estresse e consequência da ação dos glicocorticóides, em virtude da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Em nosso trabalho, a análise histológica do timo, medula óssea e adrenais de animais estressados não apresentaram alterações morfológicas. Tal ausência de alterações pode ser atribuída ao tipo e duração do estresse. Por outro lado, houve aumento no número de centros germinativos no baço de animais estressados (figura 4). O tratamento com própolis impediu tais efeitos do estresse no baço.

DOMÍNGUEZ-GERPE & REY-MÉNDEZ (2001), submetendo camundongos a estresse por imobilização por 14 dias, observaram redução no número total de timócitos e diminuição de células B nos linfonodos, mencionando que o sistema imunológico é compartimentalizado e a resposta a um agente estressor pode ser diferente em cada compartimento. Estes mesmos autores relatam que, em relação ao baço, houve aumento no número de células T esplênicas, e porcentagem inalterada de células B. Contrariamente, AVITSUR *et al.* (2002), utilizando modelo de estresse social em camundongos, observaram redução na porcentagem de células T esplênicas, mas normalidade quanto às células B.

Os centros germinativos são compostos principalmente por células B, pequena porcentagem de linfócitos T auxiliares, e células dendríticas foliculares, desenvolvendo-se em resposta à estimulação antigênica, em infecções ou outros estímulos imunológicos. Pode-se inferir que o aumento observado em nosso trabalho seja devido a citocinas produzidas durante o estresse, levando a ativação policlonal nos folículos.

A resposta imune celular é mais afetada durante o estresse, em relação à imunidade humoral. O estresse pode afetar o padrão Th1/Th2 de resposta,

direcionando-o mais para Th2, podendo suprimir a imunidade celular e reforçar a imunidade humoral, por ação de glicocorticóides e catecolaminas (ELENKOV & CHROUSOS, 1999).

Os dados demonstram que a própolis potencializou a geração de H₂O₂ por animais estressados, bem como reverteu as alterações morfológicas induzidas pelo estresse no baço, sugerindo a possibilidade de utilização deste produto apícola em momentos de estresse. Futuras investigações fornecerão maiores contribuições quanto à relação estresse-imunidade, bem como sobre a possibilidade de utilização da própolis durante o estresse.

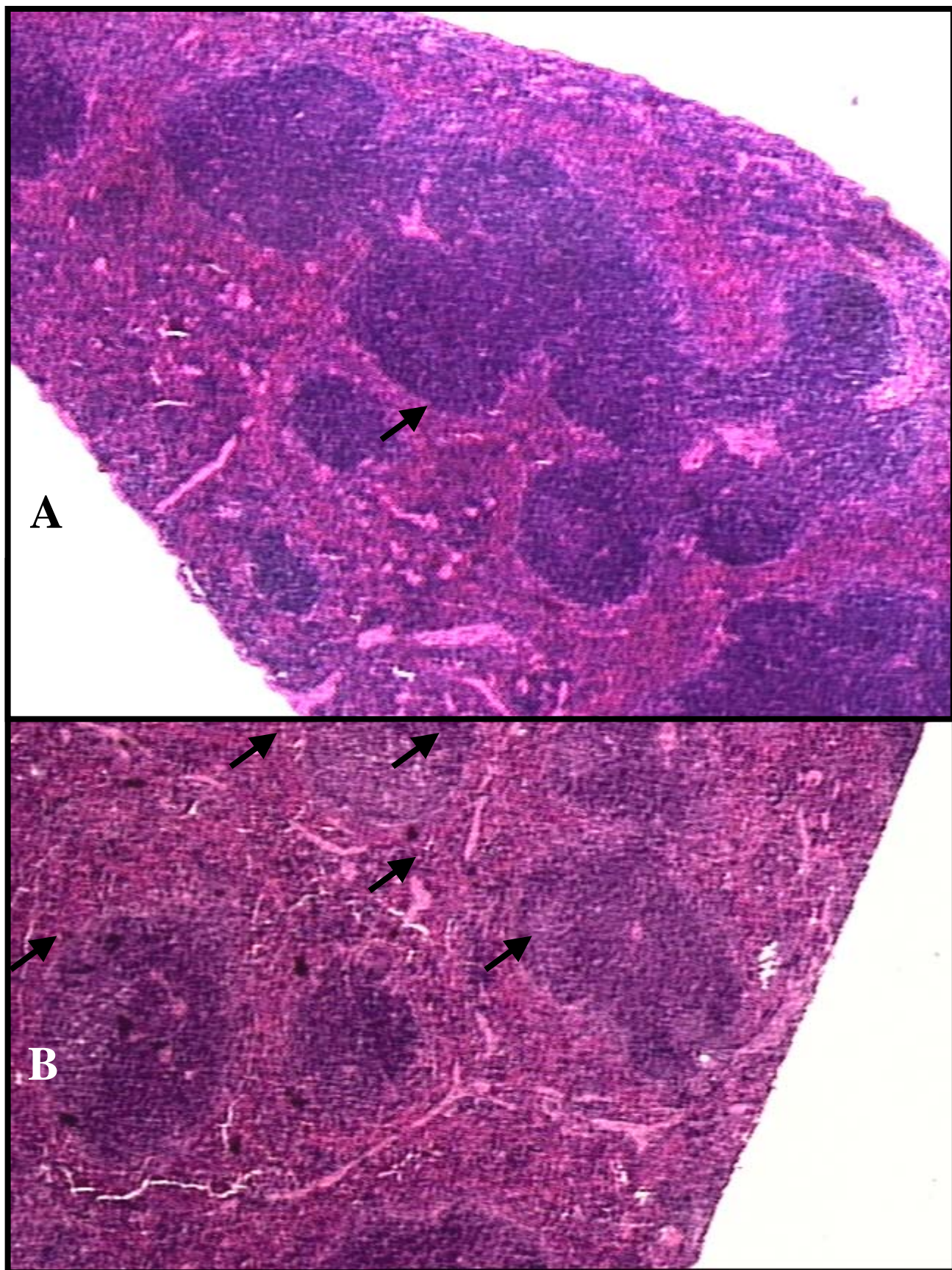


Figura 4. Corte histológico de baço de animal controle (A) e de animal sob estresse (B). Setas indicam folículos linfóides com centro germinativo bem desenvolvido

Referências

- Avitsur, R., Stark, J.L., Dhabhar, F.S., Sheridan, J.F. Social stress alters splenocyte phenotype and function. *J. Neuroimmunology*, v. 132, p. 66-71, 2002
- Azpiroz, A., Fano, E., Garmendia, L., Arregi, A., Cacho, R., Beitia, G., Brain, P.F. Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. *Psychoneuroendocrinology*, v. 24, p. 345-61, 1999
- Banskota, A.H., Tezuka, V., Kadota, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.*, v. 15, p. 561-71, 2001.
- Bauer, M. E., Vedhara, K., Perks, P., Wilcock, G. K., Lightman, S. L., Shanks, N. Chronic stress in caregivers of dementia is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.*, v. 103, p. 84-92, 2000.
- Bessler, H., Bergman, M., Salman, H. Interleukin-3 and stress. *Biomed. Pharmacoter.*, v. 54, p. 299-304, 2000.
- Dhabhar, F.S. Stress-induced augmentation of immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 16, p. 785-98, 2002.
- Domínguez-Gerpe, L., Rey-Méndez, M. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *Immunology*, v. 2, p. 7, 2001.
- Elenkov, I. J., Chrousos, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 10, p. 359-68, 1999.
- Godfrey, K. Statistics in practice. Comparing the means of several groups. *N. Engl. J. Med.*, v.313, p.1450-6, 1985.
- Green, L.C., Ruiz De Luzuriaga, K., Wagner, D.A., Rand, W., Istfand, N., Young, V.R., Tannenbaun, S.R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.78, p. 7764-8, 1981.

- Jones, T.C., Carpen, C.C., Mohr, U (Editors). Endocrine System, In: Monographs on Patology of Laboratory Animals. International Life Sciences Institute. Springer, New York, 1996, 521pp.
- Kioukia-Fougia, N., Antoniou, K., Bekris, S., Liapi, C., Christofidis, I., Papadopoulou-Daifoti, Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 26, p. 823-30, 2002.
- Kuper, C.F., Harleman, J.H., Richter-Reichelm, H.B., Vos, J.G. Histopathologic Approaches to Detect Changes Indicative of Immunotoxicity. *Toxicol Pathol.*, v. 28, p. 454-66, 2000.
- Lopes, F.C., Bankova, V., Sforcin, J.M. Effect of three vegetal sources of propolis on macrophages activation. *Phytomedicine*, v. 10, p. 343, 2003.
- Moonis, M., Ahmad, I., Bachawat, B.K. Macrophage in host defense. An overview. *Indian J. Biochem. Biophys.*, v. 29, p. 115-22, 1992.
- Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., Bankova, V., Sforcin, J.M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 79, p. 331-34, 2002.
- 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. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 6, n. 2, p. 205-19, 2000.
- Orsi, R.O., Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., Bankova, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology*, v. 5, p. 359-68, 2005.
- Palermo-Neto, J., Massoco, C. O., Fávare, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and ehrlich tumor growth. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 23, p. 497-507, 2001.
- Pick, E., Mizel, D. Rapid microassay for the measured of hydrogen peroxide produced by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, v. 46, p. 216-26, 1981.

- Reddy, P.K., Leatherland, J.F. Stress Physiology. In: Leatherland, J.F., Woo, P.T.K. Fish Diseases and Disorders: Non-Infectious Disorders, v.2, Canada: CAB International, 1998, 400p.
- Sakai, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v. 172, p. 63-92, 1999.
- Sá-Nunes, A., Faccioli, L.H., Sforcin, J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. *J. Ethnopharmacol.*, v. 87, p. 93-7, 2003.
- Selye, H. The stress of life. McGraw-Hill Book Co.: New York, 1978.
- Sforcin, J.M, Kaneno, R., Funari, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 8, p. 19-29, 2002.
- Sforcin, J.M., Orsi, R.O., Bankova, V. Effects of propolis, some isolated compounds and Baccharis extracts on antibody production. Geographic origin and seasonal effects on propolis activity. Aceito para publicação junto à revista *J. Ethnopharmacol.*, no prelo.
- Toth, G. Propolis: medicine or fraud? *Am. Bee J.*, v.125, p.337-8, 1985.
- Wakikawa, A., Utsuyama, M., Wakabayashi, A., Kitagawa, M., Hirokawa, K. Vitamin E enhances the immune functions of young but not old mice under restraint stress. *Experimental Gerontology*, v. 34, p. 853-62, 1999.
- Wazières, B., Spehner, V., Harraga, S., Laplante, F., Corallo, F., Bloy, C., Dupond, J.L, Vuitton, D. A., Seillès, E. Alteration in the production of free oxygen radicals and proinflammatory cytokines by peritoneal and alveolar macrophages in old mice and immunomodulatory effect of RU 41740 administration Part I: Effect of short and repetitive noise stress. *Immunopharmacol.*, v. 39, p. 51-9, 1998.

CAPÍTULO 3

IMPLICAÇÕES

A determinação de H_2O_2 e NO, em nosso trabalho, é de suma importância, considerando o fato de que a imunidade encontra-se comprometida em animais estressados, o que predispõe o organismo a um aumento na suscetibilidade a infecções e neoplasias, principalmente quando o estresse é de natureza crônica.

O possível papel imunorestaurador da própolis merece maiores investigações, visto que, em nossos ensaios, avaliamos somente a produção de H_2O_2 e NO. O fato de que animais estressados e tratados com própolis potencializaram a geração de H_2O_2 merece destaque, tendo como implicação possíveis infecções onde o mecanismo efetor envolve a participação deste radical livre, em momentos de estresse.

Não houve alterações no baço de animais estressados e tratados com própolis, sugerindo um possível papel protetor deste produto apícola quanto aos efeitos prejudiciais do estresse. Futuras investigações fornecerão maiores contribuições quanto à possibilidade de utilização da própolis durante o estresse.