

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE A PRODUÇÃO DE
CITOCINAS E EXPRESSÃO DO RECEPTOR TLR-4 POR
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A ESTRESSE**

ANA CAROLINA PAGLIARONE

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada

Botucatu - SP

2009

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE A PRODUÇÃO DE
CITOCINAS E EXPRESSÃO DO RECEPTOR TLR-4 POR
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A ESTRESSE**

ANA CAROLINA PAGLIARONE

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada

Botucatu - SP

2009

Resumo

O estresse pode exercer atividades imunossupressoras, acarretando o desenvolvimento de doenças como câncer, inflamações crônicas, neurodegeneração, autoimunidade, além de maior susceptibilidade a infecções por microrganismos. Os recém-descobertos receptores *Toll-like* (TLRs) têm sido extensamente investigados recentemente por reconhecer microrganismos patogênicos, ativando, consequentemente, a resposta imune. Devido ao pouco conhecimento quanto ao papel da própolis no sistema imune desafiado pela ação do estresse, o objetivo deste trabalho foi verificar o possível efeito deste apiterápico sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e de padrão Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-10), e sobre a expressão do receptor TLR-4 por células esplênicas de camundongos submetidos a estresse. Camundongos BALB/c foram divididos em 3 grupos: G1 (controle), G2 (estresse) e G3 (própolis + estresse). G2 foi submetido a estresse por imobilização por 3 dias consecutivos, e G3 foi tratado com própolis e submetido a estresse. Após o sacrifício, o sangue foi coletado para a dosagem de corticosterona, como indicador de estresse. O baço de cada animal foi extraído e culturas celulares foram estimuladas com LPS por 24h ou com Con A por 48 h para determinação da produção de citocinas. Parte do baço foi utilizada para a realização de PCR quantitativo em tempo real a fim de verificar a expressão gênica de TLR-4 pelas células esplênicas. Os grupos submetidos a estresse, tratados ou não com própolis, apresentaram aumento na concentração de corticosterona. Houve inibição na produção de IL-1 β e IL-6 nestes mesmos grupos, em comparação ao controle. Não houve alterações na produção de IL-2 em nenhum dos grupos, enquanto que a de IFN- γ esteve inibida nos grupos submetidos a estresse, tratados ou não com própolis. Já a produção de IL-4 apresentou-se inibida nos animais submetidos a estresse, sendo o tratamento com própolis capaz de reverter esta inibição. Não houve alteração na produção de IL-10 nos grupos experimentais. A expressão gênica de TLR-4 foi inibida nos animais submetidos a estresse, e o tratamento com própolis exerceu atividade imunorestauradora quanto a esta expressão. Pode-se concluir que a própolis exerceu papel imunorestaurador quanto à recuperação dos níveis de IL-4 e à expressão de TLR-4, auxiliando o hospedeiro no reconhecimento de microrganismos durante o estresse, e favorecendo a resposta imune humoral.

Palavras-chave: Própolis; estresse; citocinas; receptor *Toll-like* 4

Abstract

Stress can exert immunosuppressive activities, which lead to the development of diseases such as cancer, chronic inflammation, neurodegenerative dysfunctions, autoimmunity and a higher susceptibility to infectious microorganisms. Recently, Toll-like receptors (TLRs) have been widely investigated for recognizing pathogenic microorganisms and, as a consequence, activating the immune response. Since little is known about propolis effects on the immune system challenged by stress, the aim of this work was to verify the possible effect of this bee product on pro-inflammatory (IL-1 β and IL-6), Th1 (IFN- γ and IL-2) and Th2 (IL-4 and IL-10) cytokines and on TLR-4 expression by spleen cells from stressed mice. BALB/c mice were divided into 3 groups: G1 (control), G2 (stress) and G3 (propolis + stress). G2 was submitted to restraint stress for 3 consecutive days and G3 was treated with propolis and immediately submitted to stress. After sacrifice, blood was collected for corticosterone determination as a stress indicator. Spleens of all groups were removed and cell cultures were stimulated with LPS for 24h or with Con A for 48 h to further cytokines determination. A portion of the spleens was used for quantitative PCR real time assay in order to verify TLR-4 gene expression. An increased corticosterone concentration was seen in stressed groups, treated or not with propolis. IL-1 β and IL-6 production was inhibited in these same groups, comparing to control. No alterations were found in IL-2 production in the experimental groups, while IFN- γ was inhibited on stressed group even when treated with propolis. IL-4 production was inhibited on stressed mice, but propolis treatment was able to antagonize this inhibition. There were no alterations in IL-10 production between the experimental groups. TLR-4 expression was inhibited in stressed mice, but propolis treatment exerted an immunorestorative activity in this receptor expression. One may conclude that propolis treatment recovered IL-4 levels and TLR-4 expression, helping the host to recognize microorganisms during stress, and favoring humoral immune response.

Keywords: Propolis; stress; cytokines; Toll-like receptor 4

INTRODUÇÃO

1. PRÓPOLIS

1.1. Definição, origem e composição química	8
1.2. Utilização da própolis pelo Homem	10
1.3. Propriedades biológicas e imunológicas	11
1.4. Própolis e efeitos colaterais	15

2. ESTRESSE

2.1. Conceitos e tipos de estresse	17
2.2. Mecanismos de ativação do estresse	19
2.3.Regulação do eixo HPA: <i>Feedback</i> negativo, Habituação e Sensibilização	20
2.4. Interação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico	23
2.5. Principais hormônios do estresse e o sistema imune	25
2.6. Relação entre estresse e doenças	29

3. RECEPTORES *TOLL-LIKE* (TLRs)

3.1. Estrutura e função	31
3.2. Mecanismos de sinalização	33
3.3. TLRs e resposta imune celular e humoral	35
3.4. TLRs e doenças	37
3.5. Regulação da ativação dos TLRs	38

3.6. TLRs e seus efeitos durante o estresse	41
OBJETIVOS	
Objetivos gerais e específicos	45
CAPÍTULO 1	
“Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice”	47
CAPÍTULO 2	
“Propolis effect on pro-inflammatory cytokines production and TLR-4 expression by stressed mice “	67
CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Introdução

Introdução

1. Própolis

1.1. Definição, origem e composição química

Própolis é o nome dado à substância resinosa, adesiva e de odor característico que é coletada pelas abelhas a partir de fissuras de cascas de árvores, botões foliares e em exudatos (Bankova, 2005). A palavra própolis é proveniente do Grego, sendo que o prefixo *pro* significa “em prol de”, ou “em defesa de”, enquanto que o sufixo *polis* significa “cidade”. Assim, a própolis tem a função de “defender a cidade”, ou seja, a colméia (Ghisalberti, 1979).

A própolis é empregada para diferentes finalidades relacionadas com a proteção da colméia. Isso se deve ao fato de que a substância é utilizada para selar aberturas, envernizar as paredes dos favos antes das posturas dos ovos, embalsamar cadáveres de intrusos para impedir a proliferação de bactérias e de fungos, além de servir como isolante térmico (Salatino *et al.*, 2005).

Várias espécies são consideradas como fontes vegetais da própolis. No Brasil, sugere-se que espécies dos gêneros *Araucaria*, *Clusia*, *Baccharis*, *Vernonia*, *Weinmania*, *Diclenia*, *Hyptis*, *Eucalyptus*, *Populus*, dentre outras, são visitadas pelas abelhas para a coleta da resina, dependendo da região geográfica do país (Banskota *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003). Na região de Botucatu, no Sudeste brasileiro, *Araucaria angustifolia* (Bertolini) Otto Kuntze (“pinheiro-do-Paraná”), *Baccharis dracunculifolia* D.C. (“alecrim do campo” ou “vassourinha”) e *Eucalyptus citriodora* Hook são importantes fontes vegetais da própolis (Bankova *et al.*, 1999). Segundo Teixeira *et al.* (2005), as abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) possuem preferência por *Baccharis dracunculifolia* como fonte de própolis no Brasil. A própolis originária deste vegetal nativo é comumente conhecida como “própolis verde” devido a sua coloração (Park *et al.*, 2002; Kumazawa *et al.*, 2004).

A própolis é dotada de uma complexa composição química e seus componentes químicos variam dependendo da origem vegetal. Em geral, a própolis é composta de

50% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos vegetais, 5% de pólen e 5% de impurezas (Marcucci, 1995). Sua coloração também é variável, podendo ser amarela, vermelha, verde ou marrom, dependendo de fatores, como a sua origem vegetal e composição química (Salatino *et al.*, 2005).

Análises químicas mais detalhadas indicam que este produto natural possui mais de 300 substâncias diferentes, como polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres), terpenóides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, açúcares, vitaminas, minerais, dentre outros (Bankova *et al.*, 2000; Castro, 2001). Ademais, sua composição pode variar quantitativa e qualitativamente, dependendo da origem vegetal, da estação do ano e da espécie da abelha (Kumazawa *et al.*, 2004; Bankova, 2005).

A própolis utilizada nos procedimentos experimentais em nosso laboratório foi coletada em colméias de abelhas *Apis mellifera* L. presentes na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Campus de Botucatu, e sua composição química foi analisada detalhadamente por cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia em camada delgada (TLC). Os principais componentes identificados foram: compostos fenólicos (flavonóides, ácidos aromáticos e benzopiranos), di e tri-terpenos, óleos essenciais, dentre outros (Boudourova-Krasteva *et al.*, 1997 ; Bankova *et al.*, 1998).

A composição química entre o material resinoso e a própolis provindos de mesma fonte vegetal apresenta algumas diferenças, devido a alguns componentes que estão presentes no material da fonte vegetal, mas não na própolis e vice-versa. Isso ocorre uma vez que a abelha, no ato da coleta da resina, mastiga o material, secretando assim substâncias do seu metabolismo que, por sua vez, irão modificar a composição final da própolis. Essa modificação ocorre devido à ação das glicodiasas, enzimas das glândulas hipofaríngeas que hidrolisam compostos fenólicos como os flavonóides, resultando em derivados como flavonas, flavonóis, dihidroflavonóis e chalconas (Marcucci *et al.*, 2001; Najafi *et al.*, 2007). Ademais, impurezas como pólen e cera também são introduzidos pelas abelhas (Burdock, 1998).

Por outro lado, é possível identificar a fonte vegetal de uma amostra de própolis através de substâncias encontradas tanto na resina (ou no extrato de partes vegetais como as folhas) quanto na própolis. Bankova *et al* (1999) realizaram análises químicas comparativas entre diferentes amostras de própolis brasileira e observaram que estas possuíam compostos também presentes em *Baccharis dracunculifolia*, como artepilina C, ácido *p*-cumárico, dentre outros. Apesar disso, há casos nos quais há compostos

presentes na própolis que podem ser encontrados em mais de uma fonte vegetal, como foi observado por Midorikawa *et al.* (2001), sugerindo que a abelha pode visitar mais de uma fonte vegetal para a posterior confecção da própolis (Silici & Kutluca, 2005).

1.2. Utilização da própolis pelo Homem

A longa história da domesticação de abelhas pelo Homem levou à exploração dos produtos elaborados por estes insetos e, devido às suas propriedades favoráveis, este produto natural vem sendo utilizado há séculos pelos seres humanos.

O uso da própolis pelo Homem ocorre desde cerca de 300 a.C. pela medicina popular de vários povos antigos. A propriedade anti-putrefativa da própolis era bem conhecida pelos egípcios, os quais a utilizavam para embalsamar cadáveres. Já os incas tinham o conhecimento de sua ação anti-pirética. Foi também empregada como anti-séptico e cicatrizante em feridas, perpetuando o seu uso durante a Idade Média pelos povos europeu e árabe (Castaldo & Capasso, 2002). Atualmente, além de ser aplicada em produtos farmacêuticos e cosméticos, a própolis também é introduzida na alimentação em conjunto com outros produtos apícolas como o mel e a geléia real (Viuda-Martos *et al.*, 2008). A própolis também tem sido empregada na fabricação e manutenção de instrumentos musicais desde o século XVII, sendo ainda utilizada para este fim (Van Ketel & Bruynzeel, 1992).

Em práticas experimentais, a própolis não é utilizada na forma bruta, devendo ser extraída por ação de solventes para a remoção do material inerte e preservação dos compostos ativos. A extração por etanol é particularmente recomendável para melhor obtenção dos compostos fenólicos, principais componentes ativos da própolis (Pietta *et al.*, 2002). Assim, o etanol é comumente utilizado como solvente, sendo utilizado em concentrações que variam de 70 a 95%. O etanol absoluto também pode ser utilizado (Sawaya *et al.*, 2004; Popova *et al.*, 2005).

A preparação da própolis bruta requer alguns procedimentos. Primeiramente a própolis depositada nas colméias é submetida à raspagem para ser retirada. Posteriormente ela passa por um processo de secagem por ar seco ou através de estufas para a retirada da cera externa. A própolis seca então é congelada para facilitar a maceração. Uma amostra deste macerado é pesada e adicionada ao solvente, permanecendo deste modo por 24h à temperatura ambiente. O material é pesado e o procedimento é repetido diversas vezes para que haja a completa obtenção dos

compostos fenólicos. Finalmente, a parte insolúvel é filtrada e re-dissolvida para posterior utilização (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Embora o extrato etanólico da própolis (em diferentes concentrações) seja mais comumente utilizado, estudos utilizando extrato aquoso estão sendo muito executados. Ademais, tem-se mostrado que o extrato aquoso exerce boa atividade antioxidante, sendo associado com altas quantidades de compostos fenólicos (Nagai *et al.*, 2003). O método de preparo dos extratos de própolis pode influenciar sua atividade, uma vez que os diferentes solventes solubilizam e extraem compostos diferentes.

O uso deste produto apícola desde a Antiguidade na medicina popular ainda persiste nos dias atuais, uma vez que o Homem foi desvendando cada vez mais as suas propriedades biológicas favoráveis à saúde. Deste modo, o interesse pelas ações da própolis sobre o sistema imune tem sido amplamente investigado, a fim de compreender os mecanismos de ação deste produto natural contra infecções e células tumorais, bem como na resposta inflamatória. Estes estudos são extremamente importantes para um possível emprego da própolis como agente terapêutico em tratamentos contra diversas doenças, podendo talvez substituir drogas que, muitas vezes, podem levar a efeitos colaterais.

1.3. Propriedades biológicas e imunológicas

Uma das propriedades biológicas da própolis que é popularmente mais conhecida é a sua atividade anti-inflamatória. Pesquisadores têm observado seu efeito imunoregulador frente à produção de fatores envolvidos no processo inflamatório, como citocinas, prostaglandina, quimiocinas, dentre outros. Hu *et al.* (2005) observaram que extratos aquoso e etanólico de própolis diminuíram a extensão da resposta inflamatória através da inibição da produção de prostaglandina e de óxido nítrico (NO), além de um possível impedimento da ativação de macrófagos. O efeito anti-inflamatório da própolis sobre a produção de NO também foi observado por outros autores em camundongos com edema de pata (Tan-No *et al.*, 2006). Um outro mecanismo pelo o qual a própolis pode conter a inflamação seria através da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, o que foi observado por Sy *et al* (2006) em camundongos sensibilizados com ovoalbumina (OVA) os quais apresentaram diminuição da inflamação pulmonar, além do nível sérico de IgE e de IgG1. Deste modo, a própolis poderia ser um possível agente terapêutico contra asma. O mesmo efeito inibitório na produção de citocinas pró-

inflamatórias foi reportado por Ansorge *et al.* (2003) em culturas de células mononucleares do sangue periférico e de linfócitos T humanas, seguida por alta produção da citocina anti-inflamatória TGF- β .

A própolis também é considerada como um importante agente microbicida, agindo contra uma gama de microrganismos como fungos, bactérias, e parasitas (Nostro *et al.*, 2006; Pontin *et al.*, 2008). Estudos realizados em nosso laboratório constataram a ação antimicrobiana da própolis em diferentes tipos de microrganismos, como *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (Sforcin *et al.*, 2001), *Salmonella* Typhimurium (Sforcin *et al.*, 2000) e *Giardia duodenalis* (Freitas *et al.*, 2006).

O efeito da própolis contra diferentes vírus também tem sido analisado. Huleihel & Isanu (2002) observaram o papel do extrato aquoso da própolis contra o vírus da herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em ensaios *in vitro* e *in vivo*, com inibição de 80 a 85% da infecção viral. Estes autores sugerem uma provável ação da própolis em relação à entrada no vírus na célula hospedeira ou no ciclo de replicação viral intracelular. Shimizi *et al.* (2008) observaram que o tratamento com própolis levou à inibição da perda do peso corporal e ao aumento da sobrevivência de camundongos infectados com o vírus influenza por via respiratória. Nosso grupo de pesquisa observou que a própolis e o extrato da *Baccharis dracunculifolia* exerceram ação contra o poliovírus tipo 1 (PV-1) *in vitro* (Bufalo *et al.*, submetido).

Uma outra importante propriedade da própolis que tem sido cada vez mais investigada atualmente é a sua ação antitumoral. Inoue *et al.* (2008), ao tratar células de sarcoma murino com extrato aquoso de própolis, observou diminuição significativa no crescimento tumoral. O mesmo foi observado em animais submetidos a tratamento *in vivo*, onde, através de análises histológicas, foi observada inibição da invasão tumoral no tecido muscular. Nosso laboratório observou que a própolis aumentou a atividade citotóxica de células *natural killer* (NK) em ratos tratados com própolis durante 3 dias contra células de linfoma (Sforcin *et al.*, 2002a).

Com relação ao sistema imunológico, a incubação de macrófagos peritoneais de camundongos com própolis induziu aumento de sua atividade e da subsequente produção de NO e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Tatefuji *et al.*, 1996; Orsi *et al.*, 2000), uma vez que estes metabólitos afetam o crescimento dos microrganismos em diferentes períodos durante a fagocitose (Vazquez-Torres *et al.*, 2000).

A própolis pode exercer importante ação na indução da resposta imune humoral. Scheller *et al.* (1988) observaram que o extrato etanólico de própolis estimula a produção de anticorpos por camundongos BALB/c imunizados com hemácias de carneiro. Isso também foi observado por nosso grupo em ratos imunizados com albumina sérica bovina e tratados com própolis durante 3 dias (Sforcin *et al.*, 2005). Fischer *et al.* (2007) demonstraram que a própolis pode ser um importante adjuvante em vacina contra o vírus da herpes suína tipo 1 (SuHV-1) quando associada com hidróxido de alumínio, estimulando tanto a atividade humoral (através da neutralização de anticorpos) quanto a atividade celular em camundongos (através da indução de mRNA de IFN- γ por células esplênicas).

Takagi *et al.* (2005) observaram que a própolis pode proteger o sistema imune contra os efeitos deletérios da radiação, uma vez que esta enfraquece a resposta imunológica por diminuir o número de linfócitos. Assim, estes autores observaram que animais submetidos a radiação e tratados com própolis apresentaram maior número de células T CD4⁺ e T CD8⁺, além de maior produção de IFN- γ .

A complexa composição química da própolis pode ser a resposta da existência das diversas atividades exercidas por este produto apícola. Isso porque a partir do momento em que seus compostos foram sendo identificados, o interesse dos pesquisadores em relação às ações destes componentes foi crescente, resultando em muitos estudos que revelaram (e ainda revelam) o potencial destas substâncias no sistema imunológico.

Os compostos fenólicos são os que mais são destacados dentre os componentes da própolis, uma vez que são considerados responsáveis pela grande parte das propriedades deste apiterápico. Isso se deve ao fato de que os compostos fenólicos, (como também a própolis), exercem múltiplos efeitos, como antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórios, anti-cancerígenos, dentre outros (Havesteen, 2002; Sá-Nunes *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006). Há relatos de que estes compostos podem exercer ação estimuladora sobre as células imunes a produzir citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- γ (Orsolich *et al.*, 2005a) promovendo o aumento das respostas imunes humoral e celular.

O cafeato de fenil etila (CAPE) e o ácido caféico (CA) são considerados os principais compostos ativos da própolis, sendo assim muito estudados quanto às suas propriedades. Vários trabalhos têm demonstrado o potencial anti-tumoral destes dois compostos. Camundongos inoculados com células de tumor mamário transplantável

(MCA) e apresentando metástases pulmonares, apresentaram menor número de nódulos tumorais pulmonares quando tratados com CAPE, CA e quercetina. Este efeito deve-se à capacidade destas substâncias de induzir apoptose e necrose em células tumorais (Orsolic *et al.*, 2004). Comparativamente, o CAPE é mais eficiente na ação antitumoral do que o CA, uma vez que apresenta maior facilidade em atravessar membranas celulares. Ademais, o CAPE é capaz de diferenciar células normais de células tumorais (Orsolic *et al.*, 2005b), assim como a própolis (Najafi *et al.*, 2007).

A ação anti-inflamatória do CAPE também tem sido largamente relatada. Ele é capaz de exercer este efeito através da inibição de leucotrieno e de prostaglandina via inibição da ciclooxigenase (COX), além de impedir o NF- κ B, fator de transcrição nuclear pró-inflamatório, de se ligar ao DNA, levando a supressão da expressão gênica de citocinas inflamatórias (Natarajan *et al.*, 1996). Borelli *et al.* (2002) observaram que em camundongos submetidos à inflamação induzida por carragenina nas patas, tanto o tratamento com o CAPE isoladamente quanto em conjunto com a própolis, foram capazes de inibir a inflamação, sendo o CAPE o mais eficiente. A diferença entre os resultados sugere que os compostos da própolis podem atuar de forma sinérgica, podendo influenciar na atividade total do produto.

A própolis brasileira não possui compostos fenólicos em alta quantidade (Bankova *et al.*, 2000), o que faz com que suas propriedades ocorram pela presença de outros compostos. Foi observado que artepilina C, drupanina e ácidos *p*-cumárico e caféico são os principais componentes da própolis do sudeste do Brasil (Kumazawa *et al.*, 2003). Por outro lado, a própolis européia tem suas propriedades atribuídas aos compostos fenólicos (Hegazi *et al.*, 2000), o que necessariamente não significa que possa haver diferenças qualitativas entre as duas amostras de própolis (Bankova, 2005). Orsolic & Basic (2005) não observaram diferenças significativas na ação antitumoral entre a própolis brasileira e a croata. Já Kujumgiev *et al.* (1999) observaram que amostras originárias da América do Sul e da Europa apresentaram semelhantes atividades antimicrobiana, antiviral, cicatrizante, anti-inflamatória, dentre outras, mesmo tendo composição química extremamente distintas. Assim, a quantidade de compostos presentes na própolis não reflete diretamente a sua ação biológica.

Um bom exemplo de um composto presente somente na própolis brasileira e que tem demonstrado importantes efeitos no sistema imune é a artepilina C, composto encontrado em grandes quantidades, tanto na própolis quanto em *Baccharis dracunculifolia* (Kimoto *et al.*, 2001). Shimizu *et al.* (2004) observaram o papel

antioxidante da artepilina C de modo dose-dependente na inibição da peroxidação lipídica em células hepáticas humanas. Este composto também tem sido alvo de estudos em relação às suas ações antitumoral (Ahn *et al.*, 2007) e anti-inflamatória (Paulino *et al.*, 2008).

Assim, nota-se que é surpreendente que amostras de própolis originárias de diferentes regiões geográficas, mesmo contendo composições químicas distintas, possam exercer o mesmo tipo de atividade biológica, e até mesmo, em alguns casos, estas atividades não apresentarem diferenças significativas em sua efetividade. Assim, segundo Bankova (2005), seria importante haver uma detalhada análise da composição química, da origem vegetal e das propriedades biológicas a fim de identificar e especificar as distintas amostras de própolis existentes.

1.4. Própolis e efeitos colaterais

Apesar do uso popular da própolis durante séculos, ainda pouco é conhecido sobre os efeitos colaterais deste produto apícola. Deste modo, pesquisadores têm realizado ensaios experimentais com a finalidade de investigar a existência de efeitos tóxicos da própolis no organismo após a sua administração.

Hrytsenko *et al.* (1977) relataram que a própolis apresentou DL₅₀ de 2050 mg/kg e DL₁₀₀ de 2750 mg/kg. Já Burdock (1998) relatou que a DL₅₀ da própolis pode variar de 2000 a 73000 mg/kg em camundongos, enquanto que a concentração segura para humanos seria de aproximadamente 1,4 mg/kg por dia (aproximadamente 70 mg/dia). Tais resultados mostram que a própolis é dotada de baixa toxicidade.

Vários parâmetros fisiológicos foram avaliados após a administração de própolis em diferentes concentrações. Kaneeda & Nishima (1994), após tratamento de camundongos por duas semanas com extratos etanólicos de própolis brasileira e chinesa (em concentrações de 2230 a 4000 mg/kg), não observaram óbitos e nem anormalidades anatômicas nos animais. Hollands *et al.* (1991) trataram camundongos com própolis a fim de se obter o consumo diário de 4600 mg/kg durante 90 dias para posterior análise da glicemia, colesterol e uréia. Os pesquisadores não observaram nenhuma alteração destes parâmetros fisiológicos.

Nosso grupo de pesquisa também teve o interesse em estudar os efeitos toxicológicos da própolis, investigando alterações em componentes bioquímicos de importância clínica. Sforcin *et al.* (2002b) demonstraram que a administração da

própolis duas vezes por dia durante 3 dias não alterou a concentração sérica de proteínas totais, glicose, uréia, creatinina, triglicérides, colesterol, dentre outros. O mesmo foi observado por Mani *et al.* (2006) após tratamento com diferentes concentrações de própolis (1, 3 e 6 mg/kg/dia) por 30, 90 e 150 dias.

Por outro lado, há trabalhos que evidenciaram efeitos mutagênicos e citotóxicos da própolis em ensaios *in vitro* (Tavares *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007). Senedese *et al.* (2008) investigaram a atividade mutagênica de formulações comerciais de própolis para uso tópico, a fim de investigar a ocorrência de aberrações cromossômicas. As formulações tópicas estudadas não exerceram nenhum efeito mutagênico, exceto pelo gel de própolis de maior concentração. Já Munari *et al.* (2008) observaram que em maior quantidade, o extrato de folhas de *Baccharis dracunculifolia* induziu maior número de aberrações cromossômicas em células ovarianas de hamster, enquanto que, em menores concentrações, exerceu efeito antimutagênico. Segundo estes autores, os efeitos mutagênicos e antimutagênicos ocorrem devido aos flavonóides e fenilpropanóides presentes na própolis, podendo ser pró- ou antioxidantes, dependendo da concentração. Esse mesmo efeito foi observado por outros autores (Lima *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2006).

Pereira *et al.* (2008), por sua vez, avaliaram os efeitos citotóxicos da própolis brasileira em ensaios *in vivo*, onde camundongos administrados com diferentes doses de própolis (1000, 1500 e 2000 mg/kg) por via oral apresentaram danos no DNA em células do sangue periférico. Já Resende *et al.* (2007) não observaram atividade mutagênica em extrato de *Baccharis dracunculifolia*. Isso sugere que a metabolização exercida pelas enzimas das abelhas sobre o material coletado da *Baccharis dracunculifolia* possa ser responsável pelos diferentes resultados obtidos nestes ensaios.

A partir das observações apresentadas até o momento, pode-se notar que o conhecimento sobre os efeitos da própolis (tanto negativos quanto positivos) ainda carece de mais investigações. Isso se deve à presença de obstáculos, como a complexa composição química, a carência de conhecimento dos seus exatos mecanismos de ação, a não padronização do preparo dos extratos de própolis e a diversidade química existente entre diferentes tipos de própolis, o que leva a efeitos distintos. Deste modo, ainda há muito para ser investigado a fim de se obter o conhecimento e resultados suficientes para a recomendação segura da utilização da própolis em práticas terapêuticas humanas.

2. Estresse

2.1. Conceitos e tipos de estresse

O conceito de estresse foi apresentado inicialmente por 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. 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).

Em resposta à condição de estresse, Selye denominou como “Síndrome Geral de Adaptação” os eventos de resposta ao estresse que ocorrem em três importantes fases (figura 1): a reação de alarme, na qual o organismo percebe o estímulo estressante; a fase de resistência, que consiste na tentativa de adaptação do organismo frente ao estímulo, e por fim a fase de exaustão, quando o organismo perde a capacidade de adaptação (Selye, 1978).

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

ratos submetidos a estresse por imobilização por 2h em 2 dias consecutivos, observaram aumento na produção de anticorpos contra hemácias de carneiro, evidenciando que a resposta imune adaptativa pode ser ativada pelo estresse agudo.

Por outro lado, há evidências de que as respostas ao estresse crônico possam causar, clinicamente, relevante imunossupressão (Vedhara *et al.*, 1999; Jacobs *et al.*, 2001), embora nem sempre haja concordância entre os pesquisadores quanto ao tipo, duração e intensidade do estresse psicológico.

Além de crônico ou agudo, o estresse também pode ser classificado dependendo do tipo do agente estressor. Há o estresse físico (dor, choque, exposição ao frio), químico (por ação de drogas) ou psicológico (distúrbios sociais, situações de medo, imobilização) (Pruett, 2003).

2.2. Mecanismos de ativação do estresse

Dois componentes distintos e envolvidos na ativação da resposta ao estresse são o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo (SNA). Assim, a resposta do organismo ao estresse está associada à sua ativação, acarretando mudanças nas concentrações de vários mediadores relacionados ao estresse (De Vente *et al.*, 2003).

A ativação do eixo HPA inicia-se através dos impulsos nervosos originários do estresse que são transmitidos para o hipotálamo. O hipotálamo, por sua vez, secreta o CRH, o qual passa pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário, chegando até a hipófise anterior. Neste local, o CRH induz a secreção do ACTH, que flui pela corrente sanguínea até o córtex da adrenal, induzindo a secreção de glicocorticóides como o cortisol e aldosterona (Selye, 1978).

Nem sempre os níveis de ACTH e de glicocorticóides encontram-se elevados durante o estresse. Ostrander *et al.* (2006) observaram que animais submetidos a estresse crônico apresentaram menor concentração de ACTH liberado do que a de corticosterona. Embora se tenha pensado classicamente que a produção de glicocorticóides seria estimulada somente através da liberação de ACTH, estudos sugerem que a produção de glicocorticóides também pode ser modulada por mecanismos ACTH-independentes (Ulrich-Lai & Engeland, 2000).

Já o SNA ativado, resulta na secreção de acetilcolina que induz a medula da adrenal a liberar epinefrina e norepinefrina na corrente sanguínea (Marketon & Glaser,

2008). Uma vez liberadas, as catecolaminas induzem aumento da frequência cardíaca, do fluxo sanguíneo para os músculos, da glicemia e do metabolismo celular, na tentativa de favorecer um melhor desempenho físico e mental durante o estresse. A ativação do SNA, que ocorre em segundos, permite a resposta adaptativa ao estressor, enquanto que o eixo HPA, por sua vez, apresenta uma resposta mais lenta, envolvendo a liberação dos glicocorticóides, os quais, dependendo da quantidade em que são secretados, podem levar à imunossupressão (De Vente *et al.*, 2003).

A ativação sustentada ou freqüentemente repetitiva dos dois eixos, sem a presença de recuperação (relaxamento), resulta em desenvolvimento de doenças. Essa ativação sustentada é o resultado da prolongada exposição ao estressor, ao qual o indivíduo não consegue se adaptar. Elevada pressão sanguínea pode ser considerada sinal de desregulação do SNA, enquanto que a hiper- ou hiposecreção de cortisol é um indicativo da desregulação do eixo HPA (Eriksen *et al.*, 1999; De Vente *et al.*, 2003). Por outro lado, as respostas desencadeadas pelo estímulo estressor podem ser reguladas por complexos mecanismos de *feedback* frente aos mediadores neuroendócrinos (De Kloet, 2000).

2.3. Regulação do eixo HPA: Feedback negativo, Habituação e Sensibilização

O *feedback* negativo é um mecanismo regulatório que inibe a liberação exacerbada dos hormônios pituitários-adrenais durante a ativação do eixo HPA induzida pelo estresse. A inibição do eixo HPA pelo *feedback* negativo é mediada pelos glicocorticóides e por seus receptores no hipocampo, hipotálamo e na pituitária (Bamberger *et al.*, 1996).

Este fenômeno exercido pelos glicocorticóides sobre a secreção de ACTH e de CRH limita a duração da exposição total do organismo aos próprios glicocorticóides, inibindo deste modo seus efeitos imunossupressores. Os receptores envolvidos nesta ação inibitória sobre eixo HPA incluem o receptor mineralocorticoide (MR), que responde a níveis basais de glicocorticóides, e o receptor para glicocorticoide (GR) que responde a concentrações mais altas, devido a diferenças na sensibilidade destes receptores a estes hormônios (Charmandari *et al.*, 2005).

O *feedback* negativo pode ser tardio, quando o efeito inibitório dos glicocorticóides leva horas para ocorrer, ou rápido (após segundos ou minutos), dependendo do tipo de estresse ao qual o indivíduo está submetido ou da resposta

adaptativa do mesmo frente ao agente estressor (Bielajew *et al.*, 2002). Por outro lado, quando o mesmo estressor é repetido, a resposta do eixo HPA pode se dessensibilizar, o que é denominado de “habituação”. A habituação acarreta decréscimo gradual na atividade do eixo HPA, o que se deve, pelo menos em parte, a alterações na inibição causada pelo *feedback* negativo (Marin *et al.*, 2007).

A resposta da habituação do eixo HPA ao estresse repetido pode ser resultado de pelo menos uma destas mudanças na resposta ao estresse: 1) alteração na energia excitatória dirigida ao eixo HPA; 2) variação por parte do próprio eixo HPA em responder ao estímulo do sistema nervoso. Isto porque o *feedback* negativo pode modular o estímulo nervoso que vai para o eixo HPA (*feedback* indireto) ou a resposta do eixo HPA a esse estímulo (*feedback* direto) (Dallman *et al.*, 1987). O efeito da habituação frente ao estresse crônico foi observado em nossos estudos. Camundongos submetidos a estresse crônico por 7 dias consecutivos não apresentaram diferenças significativas na produção de corticosterona plasmática em comparação ao grupo controle (Sforcin *et al.*, 2007; Missima & Sforcin, 2008).

Cole *et al.* (2000) observaram que a administração subcutânea de antagonistas de MR ou de MR e GR em conjunto, podem prevenir a habituação das respostas do eixo HPA ao estresse repetitivo por imobilização. A administração apenas do antagonista do MR também foi capaz de bloquear o efeito de habituação induzida pela corticosterona. Por outro lado, o antagonista de GR por si só não alterou os níveis do hormônio quando os animais foram estressados pela primeira vez. Ademais, estes antagonistas não exerceram nenhum efeito significativo quanto ao nível de corticosterona quando os animais receberam CRH. Deste modo, este trabalho demonstra que a habituação e seu bloqueio exercido pelos antagonistas não são resultado dependente de alterações nos níveis de CRH, demonstrando a importância do papel do MR no *feedback* negativo.

Contrariamente, a resposta do eixo HPA pode ser desinibida, sendo um possível resultado da redução da ocupação dos receptores MR. Esse fenômeno é denominado “facilitação ou sensibilização” do eixo HPA (Cole *et al.*, 2000), e pode ocorrer apesar do sinal de *feedback* negativo promovido pelos glicocorticóides durante o estresse crônico. Assim, o eixo HPA pode novamente responder ao estresse do mesmo modo ou até mesmo mais intensamente do que inicialmente (Young *et al.*, 1990).

Este evento tem sido observado em situações nas quais animais anteriormente submetidos a estresse repetido (estresse homotípico) são desafiados com um novo estressor (estresse heterotípico), levando a uma nova ativação do eixo HPA (Aguilera,

1998). Em roedores, estas adaptações têm sido monitoradas principalmente pela quantificação do nível de corticosterona em resposta ao estresse. Como exemplo, roedores repetidamente expostos a estresse por frio exibiram maior produção de corticosterona quando submetidos subsequente a estresse por imobilização (Bathnagar & Dallman, 1998). Por outro lado, Gadek-Michalska & Bugajski (2003) observaram o mesmo resultado utilizando somente um modelo de estresse. Neste trabalho, os animais já tinham sido anteriormente submetidos a estresse por imobilização crônico, mas apenas apresentaram maior produção de corticosterona quando foram novamente expostos à imobilização, mas de forma aguda. Deste modo, a desinibição do eixo HPA pode depender não só do tipo, mas também da duração do estresse.

Há vários estudos que evidenciam que a sensibilização do eixo HPA pode ser duradoura. Van Dijen *et al.* (1993) observaram que animais submetidos a anterior exposição ao estresse por choque elétrico apresentaram elevada concentração de ACTH plasmático quando expostos a estresse por ruído 14 dias após as sessões de estresse. Efeitos como perda de peso corporal, diminuição da inibição de ACTH por dexametasona (Ruis *et al.*, 1999), diminuição de apetite, aumento da temperatura corporal e diminuição da atividade exploratória em campo aberto (Meerlo *et al.*, 1997) puderam ser observados em animais anteriormente estressados por distúrbio social após dias ou semanas do término do estresse. A potencialização da sensibilização do eixo HPA ao novo estressor também pode ocorrer após curtos períodos de recuperação (entre 12 e 24h) após o estresse homotípico repetido (Bhatnagar & Dallman, 1998; Bhatnagar & Vining, 2003).

Contraditoriamente, foi observado que, em animais submetidos a 7 dias consecutivos de estresse crônico variável, houve diminuição na responsividade do eixo HPA quando submetidos a um novo estressor. Este fato pode ter ocorrido devido ao intervalo entre a cessação do estresse crônico variável e o novo estresse, ou devido à natureza do estresse crônico, ou até mesmo por estes dois fatores em conjunto (Ostrander *et al.*, 2006).

A partir destes estudos, é inegável que a inibição do *feedback* negativo é um importante regulador da responsividade do eixo HPA, uma vez que alterações na ligação dos receptores MR e GR no hipocampo e no hipotálamo foram observadas como um dos mecanismos indutores da sensibilização do eixo HPA (Buwalda *et al.*, 1999).

2.4. Interação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico

Evidências relatam fortemente a existência da correlação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico, podendo este último, ser em parte, regulado pelo eixo HPA e pelo SNA (Safieh-Garabedian *et al.*, 2002). Como essa interação é de caráter bidirecional, o sistema imune também pode enviar mensagens ao SNC, através das citocinas pró-inflamatórias.

As citocinas são importantes na investigação dos mecanismos da resposta ao estresse, uma vez que são polipeptídeos produzidos pelas células imunológicas em resposta a qualquer desequilíbrio da homeostase, como injúrias, inflamações e infecções. Além disso, elas também podem ser expressas pela maioria dos tipos celulares de regiões do cérebro. Em tecidos cerebrais de roedores, como o hipotálamo e o hipocampo, há expressão de maior número de receptores para citocinas (Vitkovic *et al.*, 2000; Kariagina *et al.*, 2004). Receptores também podem ser encontrados nas células da pituitária anterior (Ray & Melmed, 1997; Turnbull & Rivier, 1999).

Citocinas presentes na circulação sanguínea podem ativar o SNC ao atravessar a barreira hematoencefálica. Também induzem a produção de óxido nítrico sintase e ciclooxigenase por células endoteliais cerebrais, estimulando, indiretamente, as atividades do SNC (Sternberg, 2001). Como exemplo, pode-se citar a IL-1 β , que atua no núcleo paraventricular do hipotálamo, onde os neurônios que contêm o CRH estão localizados. Deste modo, o CRH é liberado, resultando na secreção do ACTH, que por sua vez, induz o córtex da adrenal a liberar os glicocorticóides (Ericsson *et al.*, 1994).

As citocinas derivadas do cérebro também ativam o eixo HPA. Por exemplo, a IL-1 induz a expressão gênica de CRH, enquanto a IL-2 estimula a secreção de AVP no hipotálamo. Já IL-6 e TNF- α estimulam a secreção de ACTH. No entanto, as citocinas cerebrais exercem principalmente o papel de fatores de crescimento para as células nervosas, protegendo-as ou induzindo-as à morte celular (Chover-Gonzalez *et al.*, 1994).

Várias citocinas, principalmente as pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), podem ativar o eixo HPA e produzir outros efeitos no sistema nervoso, como o aumento da temperatura corporal e a indução do sono (Pruett, 2003). De fato, os sintomas relacionados ao “comportamento doentio” desencadeado durante o estresse são mediados por tais citocinas (Calandra *et al.*, 2000).

Estudos envolvendo a administração de LPS ou de citocinas pró-inflamatórias como IL-1(α ou β) e TNF- α têm demonstrado que estas citocinas provocam (direta ou indiretamente) efeitos psicológicos e comportamentais, como febre (Olivier *et al.*, 2003), ativação do eixo HPA, redução de apetite, depressão, dentre outros (Bluthé *et al.*, 1994; Konsman *et al.*, 2002). Contrariamente, ao administrar citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 ou antagonistas de receptores para citocinas pró-inflamatórias (como o IL-1ra), pode-se induzir a diminuição destes efeitos (Dantzer, 2006).

Tem sido observado que a elevação no nível sérico de IL-6 está associada com estresse e depressão em humanos (Maes *et al.*, 1999; Kubera *et al.*, 2000). Esta constatação é condizente com resultados obtidos em ratos, que apresentaram elevada produção desta citocina após exposição a vários estressores. Ademais, esta elevação ocorreu em conjunto com o alto nível de corticosterona plasmática (Zhou *et al.*, 1993). A IL-6 também é capaz de mediar respostas do eixo HPA ao estresse ao induzir a produção de ACTH durante o processo inflamatório. Isto é sustentado pela observação de que a produção deste hormônio em animais deficientes em CRH, ao apresentarem o eixo HPA ativado pela IL-6, foram capazes de produzir ACTH (Chenoskova & Melmed, 2002).

Qualquer desequilíbrio entre a produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias, com predomínio das inflamatórias, pode resultar em exacerbada inflamação, tanto por células imunes quanto cerebrais, culminando, no último caso, em um impacto no comportamento e no humor, ou até mesmo à progressão de doenças neurodegenerativas (Dantzer, 2006).

Um outro fato que demonstra a relação entre diferentes sistemas na resposta ao estresse é que, além do eixo HPA, os órgãos linfóides primários e secundários (medula óssea, timo, baço e linfonodos) são inervados por fibras nervosas noradrenérgicas do SNA (Schorr & Arnason, 1999). A íntima associação destes terminais nervosos com as células imunológicas facilita a interação neuro-imune direta através de junções neuroefetoras. Norepinefrina, substância P e outros neurotransmissores são liberados nestas junções, podendo, subsequente, alterar a atividade das células imunes tanto à distância quanto proximamente (Yang & Glaser, 2002).

Monócitos, macrófagos e linfócitos possuem receptores para muitos neurotransmissores. Deste modo, mediadas por receptores para hormônios neuroendócrinos, as células linfóides e mielóides são aptas a responder aos sinais do

eixo HPA e do SNA, tendo com resultado a ativação ou inibição de suas atividades celulares (Yang & Glaser, 2002). Ademais, estudos demonstraram que, além de produzirem citocinas, os linfócitos também são capazes de sintetizar hormônios como ACTH, GH e PRL (Malarkey & Zvara, 1989; Sabharwal *et al.*, 1992).

Há evidências de que o estresse também pode alterar morfológicamente os órgãos linfóides. Selye (1978) relatou alterações no timo, linfonodos, e no baço de camundongos estressados, sendo tais efeitos induzidos pela presença dos glicocorticóides liberados durante a ação do eixo HPA. Nosso grupo de pesquisa observou que camundongos submetidos a estresse crônico por imobilização durante 7 dias consecutivos não apresentaram alterações morfológicas no timo, medula óssea e na adrenal; contudo, estes animais apresentaram maior número de centros germinativos presentes no baço (Missima & Sforcin, 2008). Tais alterações podem depender do tipo e período de estresse. Dominguez-Gerpe & Rey-Mendez (2001), ao utilizarem o modelo de estresse por imobilização durante 14 dias, observaram diminuição de timócitos e células B em linfonodos, além de relatarem que a resposta imune ao estresse pode ser variável, dependendo do compartimento do órgão imunológico avaliado. Contraditoriamente, Avitsur *et al.* (2002), utilizando modelo de estresse social, observaram redução de células T acompanhada de inalterado número de células B no baço.

2.5. Principais hormônios do estresse e o sistema imune

O eixo HPA e o SNA são vias neuroendócrinas ativadas em resposta ao estresse e controlam o sistema imune através da liberação de hormônios resultantes de sua ativação, como os glicocorticóides e as catecolaminas, respectivamente. No entanto, há outros fatores neuroendócrinos envolvidos durante o estresse, também capazes de regular o sistema imune (Marketon & Glaser, 2008).

Os glicocorticóides são comumente utilizados como agentes terapêuticos tanto em inflamações agudas quanto crônicas, além de serem utilizados para o tratamento de doenças autoimunes e de pacientes submetidos a transplantes (Barnes & Adcock, 1993; Hoffman, 1993). Isso se deve às suas ações antiinflamatórias e imunossupressoras, que ocorrem através da sua ligação com o GR. Quando não é ativado pelo seu ligante, o GR fica no citoplasma como parte de um complexo multiprotéico (receptossomo), que pode conter vários componentes, dependendo da

célula. A ligação hormonal faz com que haja mudança na conformação do complexo, liberando o GR, o qual transloca-se para o núcleo, onde liga-se a seqüências específicas de DNA, modulando a expressão de genes pró-inflamatórios (Riccardi *et al.*, 2002).

Os glicocorticóides regulam vários processos biológicos, como proliferação celular, inflamação e podem inibir o tráfego de células T, B, NK, eosinófilos, basófilos, macrófagos e monócitos (Sapolsky *et al.*, 2000; Riccardi *et al.*, 2002). Além disso, os glicocorticóides podem interferir em vias de sinalização de fatores de transcrição, como o NF- κ B e o ativador da proteína 1 (AP-1), inibindo a transcrição de moléculas pró-inflamatórias (Cato & Wade, 1996; Barnes, 2006). Também aumentam a expressão da subunidade I κ B, inibidora do NF- κ B. Por outro lado, o NF- κ B e os glicocorticóides podem ser antagonistas mútuos, uma vez que o NF- κ B também é capaz de inibir a ativação de genes responsivos aos glicocorticóides (Caldenhoven *et al.*, 1995; Scheinman *et al.*, 1995). Deste modo, estes dois sistemas de funções opostas são capazes de regular a resposta inflamatória.

É cada vez mais evidente que a atividade imunossupressora dos glicocorticoides resulta de suas ações sobre vários alvos moleculares. Dentre vários efeitos, esses hormônios regulam negativamente moléculas de adesão da superfície celular (Cronstein *et al.*, 1992), inibem a regulação do ligante de CD40 em células T CD4⁺ (Bischof & Melms, 1998) e inibem diretamente eventos de sinalização do receptor de célula T (TCR) (Baus *et al.*, 1996). No entanto, a inibição da produção de citocinas é considerada como o fenômeno biológico mais relevante da imunossupressão induzida pelos glicocorticoides. Como exemplo, foi reportado que os glicocorticóides contribuem para a diminuição da proliferação de linfócitos através da inibição de IL-1, IL-2 e IFN- γ (Elenkov *et al.*, 2000).

Inibidores de glicocorticóides, como o hormônio esteróide dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu metabólito androstenediol (AED), são importantes para a amenização dos efeitos imunossupressores destes hormônios do estresse (Loria & Padgett, 1992; Padgett *et al.*, 1998; Head *et al.*, 2006). Antagonistas de receptores para glicocorticóides também são empregados, sendo observado que camundongos tratados com antagonistas de receptores para glicocorticóides (RU40555 e RU486) apresentaram restaurada produção de citocinas, recrutamento de células inflamatórias e menor tempo de reparo de lesões (Mercado *et al.*, 2002).

Os glicocorticóides também podem exercer atividades antagônicas. Apesar de estarem relacionados com a indução de apoptose de células T, também podem inibir o

processo apoptótico através da inibição da ativação mediada pelo ligante de Fas (FasL) (Yang *et al.*, 1995). Também foi observado que glicocorticóides endógenos em níveis fisiológicos normais não são imunossupressores, podendo até mesmo aumentar a resposta imune (Tischner & Reichardt, 2008).

No tocante às atividades imunossupressoras dos glicocorticóides, é importante frisar que estes hormônios não são os únicos que podem exercer este tipo de atividade, e um outro exemplo disso são as catecolaminas (Haddad *et al.*, 2002).

As catecolaminas, assim como os glicocorticóides, também podem ser consideradas imunossupressoras. A curto prazo, elas podem inibir a proliferação de linfócitos T através de receptores β -adrenérgicos e por inibir a produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α , ou até mesmo por induzir maiores níveis de cAMP intracelular (Elenkov & Chrousos, 2006). No entanto, em certas regiões e condições, elas podem favorecer a resposta imune local, induzindo a produção de IL-1, TNF- α e IL-8 (Thyaga-Rajan *et al.*, 1999).

As catecolaminas também podem estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (Elenkov & Chrousos, 1999). Ademais, foi observado que a norepinefrina, via estímulo dos receptores β 2-adrenérgicos, aumentam a produção de anticorpos por células B (Sanders *et al.*, 1997). Um possível mecanismo para este efeito envolve o aumento da diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos mediada pelas catecolaminas. Assim, agonistas de receptores β 2-adrenérgicos potencializam a produção de IgE mediada por IL-4 em células humanas do sangue periférico, ao mesmo tempo que inibem a produção de IFN- γ por estas células (Coqueret *et al.*, 1995).

A partir destes dados, tem sido demonstrado que o estresse geralmente induz supressão da resposta imune celular (padrão Th1), não exercendo efeito significativo na imunidade humoral (padrão Th2) e em seus mecanismos efetores (Viveros-Paredes *et al.*, 2006). A ativação da resposta Th1 contribui para a imunidade celular enquanto que a ativação da resposta Th2 favorece a atividade mediada por anticorpos (Das *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2001).

As células Th1 e Th2 representam duas subpopulações de células T CD4⁺ que podem ser diferenciadas pelo padrão de citocinas que produzem. As células Th1 produzem IL-2 e IFN- γ , dentre outras, e inibem a proliferação das células Th2. Por outro lado, as Th2 secretam principalmente IL-4 e IL-10, as quais induzem a diferenciação de células Th2 e inibem as de padrão Th1 (Fiorentino *et al.*, 1989).

Tanto os glicocorticóides quanto as catecolaminas induzem a resposta imune padrão Th2, através da supressão de células apresentadoras de antígeno e da produção de citocinas Th1, estimulando a produção de citocinas Th2 (Elenkov & Chrousos, 1999). Isso ocorre porque os glicocorticóides e as catecolaminas, através da ativação dos receptores GR e β 2-adrenérgicos, respectivamente, suprimem a produção de IL-12 das células apresentadoras de antígeno (Blotta *et al.*, 1997; Hasko *et al.*, 1998). Uma vez que a IL-12 é extremamente importante para induzir a produção de IFN- γ e para inibir a síntese de IL-4 pelas células T, a supressão da citocina pelos hormônios está associada com a diminuição de IFN- γ e aumento de IL-4 por estas células (Blotta *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998). Ademais, os glicocorticóides também exercem efeito direto sobre as células Th2 regulando positivamente a produção de IL-10 e de IL-13 (Ramirez *et al.*, 1996).

Foi verificado que os receptores β 2-adrenérgicos são expressos em grande densidade em células Th1, enquanto que em células Th2 estão em quantidade indetectável, sugerindo que as catecolaminas não afetam diretamente a produção de citocinas padrão Th2. Assim, foi verificado que tanto em humanos quanto em camundongos, agonistas β 2-adrenérgicos podem inibir a produção de IFN- γ pelas células Th1, não afetando a produção de IL-4 pelas células Th2 (Sanders *et al.*, 1997).

As propriedades sistêmicas indutoras da resposta Th2 exercidas por estes hormônios do estresse podem não ocorrer em certos locais do organismo. Tratamento com glicocorticóides, por exemplo, diminuiu o número de células IL-4 positivas em mucosas brônquica e nasal (Bradding *et al.*, 1995; Bentley *et al.*, 1996). Ademais, a síntese de TGF- β é aumentada por glicocorticóides em células T humanas, mas não em células da glia (Batuman *et al.*, 1995). Baixas concentrações deste hormônio também foram capazes de ativar macrófagos alveolares e produzir IL-1 β induzida por LPS (Broug-Holub & Kraal, 1996). Por sua vez, a norepinefrina, via ativação dos receptores β 2-adrenérgicos pode aumentar a produção de TNF por macrófagos peritoneais murinos (Spengler *et al.*, 1990). O mesmo foi observado em camundongos submetidos a estresse agudo por choque elétrico ou por hemorragia, que são condições associadas a elevados níveis de catecolaminas (Le Tulzo *et al.*, 1997; Broug-Holub *et al.*, 1998).

2.6. Relação entre estresse e doenças

A Psiconeuroimunologia tem investigado por décadas a relação entre estresse e desenvolvimento de doenças. Tal relação tem se tornado cada vez mais clara devido ao insistente estudo por parte dos pesquisadores na tentativa de compreender os mecanismos através os quais o estresse pode alterar e/ou suprimir a resposta imunológica, modulando certos fatores ligados ao sistema imune como a produção de citocinas e a atividade celular.

Tanto o excesso quanto a inadequação da resposta dos hormônios do estresse estão associados com doenças, levando à suscetibilidade a infecções e a doenças inflamatórias crônicas, autoimunes e alérgicas. Assim, a ativação crônica do eixo HPA, que pode ocorrer durante o estresse, pode afetar a susceptibilidade ou o grau das doenças infecciosas através do efeito imunossupressivo dos glicocorticóides (Glaser & Kiecolt-Glaser, 1998). Em contraste, a diminuída ativação do eixo HPA está associada com alta suscetibilidade a doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (Jafarian-Tehrani & Sternberg, 1999; Eskandari *et al.*, 2003). Isto pode ser observado em animais com artrite submetidos à adrenalectomia ou após administração de antagonistas de receptores para glicocorticóides, que apresentaram aumento exacerbado do estado da doença, podendo resultar em morte dos mesmos (Harbuz *et al.*, 1993).

Mudanças fisiológicas nos níveis de glicocorticóides circulantes estão associadas com desequilíbrio no padrão de citocinas produzidas. A diminuição da resposta Th1 em relação à Th2 leva a uma maior suscetibilidade a infecções fúngicas, virais e bacterianas, tanto em animais quanto em humanos, o que faz com que esse desequilíbrio seja considerado o principal fator que leva ao desenvolvimento de doenças infecciosas (Elenkov & Chrousos, 1999).

Zhang *et al.* (1998) observaram que o estresse por imobilização inibiu a migração de leucócitos e a produção de citocinas padrão Th1, mas induziu, entretanto, aumento de citocinas padrão Th2 em animais infectados com *Lysteria monocytogenes*. Também foi observado que a infecção por *Staphylococcus aureus* é favorecida pelo estresse, uma vez que a resistência natural a microrganismos depende da habilidade das células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) em migrar para o sítio de infecção, o que é suprimido pelo estresse (Rojas *et al.*, 2002).

Além da resposta Th2 em infecções, esta também pode estar associada a reações alérgicas, asma, urticária e alergia a alimentos (Elenkov & Chrousos, 1999). Há

trabalhos que demonstram que doenças autoimunes como lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide e esclerose sistêmica estão relacionadas com alta produção de prolactina, o que acontece em situações de estresse (De Bellis *et al.*, 2005; Jara *et al.*, 2001).

Estudos também relatam que o estresse pode ser favorável quanto à ativação de viroses latentes. Foi observado que estudantes sob estresse causado por exame escolar apresentaram diminuição no controle imune contra o vírus Epstein-Barr (EBV) e herpes simples tipo 1 (HSV-1) latentes (Glaser *et al.*, 1991). Diferentes tipos de estresse também podem exercer diferentes respostas fisiológicas quanto às viroses. Bonneau *et al.* (1992) observaram que animais submetidos a estresse social apresentaram ativação do eixo HPA e reativação de HSV-1 latente. Por outro lado, este resultado não foi confirmado em animais submetidos a estresse por imobilização.

O tempo de reparação de lesões também é um fator que sofre intervenção do estresse. Indivíduos sob estresse apresentam maior tempo de reparo de lesões devido ao aumento de cortisol, o qual inibe o processo de celularização, diminui o GH e a produção de citocinas pró-inflamatórias no sítio da injúria (Marketon & Glaser, 2008). Em mulheres sob estresse psicológico foi observada diminuição da secreção de IL-1 e de IL-8 no local lesionado (Glaser & Kiecolt-Glaser, 1998). Em modelos animais de injúria por queimadura, a inibição da imunidade celular foi associada à diminuída produção de IFN- γ e de IL-12 e alta produção de IL-10 (O'Sullivan *et al.*, 1995). Camundongos submetidos a estresse por imobilização por 8 dias consecutivos apresentaram recuperação no reparo de lesões após administração do antagonista de receptor para glicocorticóide RU40555 (Padgett *et al.*, 1998).

Nas últimas décadas, pesquisadores também têm relacionado o estresse com progressão do câncer, devido a ocorrência de disfunções celulares, como dano no DNA e diminuições no número e na atividade de células protetoras como os linfócitos T e principalmente células NK (Palermo-Neto *et al.*, 2003; Bartolomucci, 2007). Antoni *et al.* (2007) observaram que estresse e pessimismo desenvolvem maior gravidade de neoplasia intraepitelial. Em animais, foi demonstrado que estresse cirúrgico e psicológico podem suprimir a atividade de células NK em ratos, suprimindo assim a resistência ao desenvolvimento tumoral (Kemeny & Schedlowsky, 2007). Também tem sido demonstrado que estresse social e estresse por isolamento podem aumentar o desenvolvimento de metástase tumoral em modelos animais (Stefanski & Ben-Eliyahu, 1996; Wu *et al.*, 2000). Essa maior suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer

induzida pelo estresse também pode ser devido à alta produção das citocinas pró-inflamatórias. Tem sido bastante reportado que IL-1 β , IL-6 e TNF- α podem exercer papel na progressão tumoral, estando envolvidas no processo da angiogênese. Como exemplo, foi observado que a IL-6 pode estimular o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Guruvayoorappan *et al.*, 2007). Pacientes portadores de câncer apresentaram maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fatores participantes no processo de metástase (Chen *et al.*, 1999). Ademais, células tratadas com IL-1 β induziram a expressão de VEGF (Pertovaara *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1996).

Estudos realizados em animais e humanos sugerem fortemente a importância do papel imunoregulador do eixo HPA e a significância biológica da sua apropriada responsividade em relação a doenças inflamatórias. Tem sido demonstrado que animais que falham ao gerar uma resposta dos glicocorticóides ao estímulo psicológico são altamente vulneráveis a inflamação (Chrousos, 1995; Sternberg, 1995). Em humanos, foi observada pouca responsividade do eixo HPA em pacientes com dermatite atópica sob estresse psicosocial (Buske-Kirshbaum *et al.*, 2002).

A partir destes dados pode-se verificar que agentes estressores afetam a resposta imune, fazendo com que o organismo fique mais vulnerável quanto à sua defesa contra doenças. O fator psicológico em relação à situação de estresse também deve ser considerado, uma vez que diferentes comportamentos (temperamento, personalidade, etc.) frente ao agente estressor podem afetar o curso da doença de diferentes maneiras (Segerstrom, 2003; Hansen *et al.*, 2005; Nakaya *et al.*, 2006).

3. Receptores Toll-like (TLRs)

3.1. Estrutura e função

Os receptores *Toll-like* (TLRs) foram uma das descobertas recentes mais importantes no campo da Imunologia devido a função que exercem na resposta imune. Estes receptores têm a capacidade de reconhecer microrganismos patogênicos e, quando ativados por estes, desencadear vias de sinalização intracelular que resultam na indução da resposta imune inata através da produção de citocinas e ativação de células (Takeda *et al.*, 2003).

Os TLRs são homólogos à proteína *Toll* descoberta em drosófilas, que foi primeiramente relacionada ao processo da formação dorso-ventral na fase embrionária destes insetos, sendo posteriormente associada a função imune a partir da observação de que drosófilas mutantes eram vulneráveis a infecções fúngicas, sucumbindo rapidamente (Lemaitre *et al.*, 1996).

Os TLRs pertencem à família dos receptores transmembrânicos tipo I, caracterizados por um domínio extracelular e um domínio intracelular. O domínio extracelular é composto por uma cadeia rica em leucina (domínio LRR) que está relacionada ao reconhecimento do microrganismo e com a transdução do sinal, além de ser também necessária para a dimerização do receptor (Kobe & Kajava, 2001). Já o domínio intracelular, denominado Toll/receptor IL-1 (TIR), tem a função de mediar interações entre o TLR e proteínas intracelulares envolvidas na transdução do sinal (Armant & Fenton, 2002). O domínio TIR é assim denominado por ser homólogo à porção citoplasmática dos membros do receptor para IL-1 (IL-1R) e para IL-18 (IL-18R) (Kimbrell & Beutler, 2001).

Os TLRs realizam o reconhecimento de microrganismos através da detecção de produtos ou estruturas microbianas conservadas, denominados de padrões moleculares patógeno-associados (PAMPs). Os PAMPs estão ausentes em células eucarióticas, mas podem estar presentes tanto em microrganismos patogênicos quanto em não-patogênicos, fazendo com que os TLRs sejam capazes de distinguir o próprio do não-próprio (Medzhitov, 2001). Contudo, o mecanismo desta capacidade ainda é desconhecido.

Os TLRs reconhecem um diverso, porém limitado, número de PAMPs. O TLR-2 reconhece uma grande quantidade de produtos microbianos, como peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-positivas, lipoproteínas, componentes de parede celular de micobactérias, dentre outros. Tal variedade de ligantes pode ser explicada, em parte, pela cooperação existente entre TLR-2 e TLR-1 ou TLR-2 e TLR-6, ocorrendo formação de heterodímeros. Já TLR-4 tem como agonistas LPS de bactérias Gram-negativas, ácido lipoteicoico (LTA) e a proteína de fusão F do vírus respiratório sincicial (RSV). Ácidos nucleicos virais ou bacterianos são reconhecidos por TLR-3/7/8 e 9 enquanto o TLR-5 tem como ligante a flagelina bacteriana (Takeda & Akira, 2005).

Pelo menos 13 TLRs já foram identificados (Roach *et al.*, 2005), sendo expressos em diferentes locais da célula. TLR-1/2/4/5/6 e 10 encontram-se na superfície

celular enquanto os TLR-3/7/8 e 9 são expressos em membranas de compartimentos intracelulares (Nicholas *et al.*, 2006). Estes receptores estão presentes tanto em células imunes como macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B e células NK, como também em células endoteliais e epiteliais (Sutmuller *et al.*, 2006).

3.2. Mecanismos de sinalização

A ativação das vias de transdução de sinal pelos TLRs induz a expressão de genes envolvidos na resposta imune do organismo, como citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (Medzhitov, 2001). Tais vias necessitam do recrutamento de componentes citoplasmáticos denominados proteínas adaptadoras ou acessórias. Dentre as existentes, podemos citar MyD88, TIRAP/Mal, IRAK-1/2/3/4, TRAF-6, TRIF e TRAM (Turvey & Hawn, 2006). A transdução de sinal pode ser classificada como dependente ou independente do MyD88.

A sinalização MyD88-dependente é compartilhada por todos os tipos de TLRs, exceto no caso do TLR-3 e TLR-4. No caso do TLR-4, pode haver dois modos de sinalização, conforme observado na figura 2 (Doyle & O'Neill, 2006). Quando o TLR é ativado pelo seu agonista, as proteínas MyD88 e TIRAP/Mal são recrutadas para o domínio intracelular TIR (exceto para TLR-7/8/9, que recrutam apenas o MyD88). O MyD88 recruta IRAK-4, o qual, ao se ligar no complexo protéico, leva a fosforilação do IRAK-1, que por sua vez, desliga-se do complexo para interagir com o TRAF-6. Posteriormente, o TRAF-6 associado com IRAK-1 liga-se ao complexo protéico TAB-1/TAB-2/TAK1 da membrana plasmática e sofre seriadas ubiquitinações. TAK-1 e TAB-2 são fosforilados, liberando assim, o complexo da membrana, ao mesmo tempo em que ocorre a degradação do IRAK-1. Consequentemente, com a ativação da TAK-1, ocorre a fosforilação do complexo citoplasmático das I κ B quinases (IKKB), o qual, ativado, induz a subsequente degradação do I κ B, liberando assim o NF- κ B. Este por sua vez, transloca-se para o núcleo ligando-se a regiões-alvo do DNA para promover a expressão das citocinas pró-inflamatórias (Lye *et al.*, 2004).

subsequente ativação do complexo IKK, resultando na liberação do NF- κ B, que por sua vez transloca-se para o núcleo. Essa ativação do NF- κ B via MyD88-independente é realizada com uma cinética mais tardia em comparação à que ocorre na sinalização MyD88-dependente (Akira & Takeda, 2004).

O TRIF também pode realizar uma terceira ligação, desta vez com o complexo IKK ϵ /TBK-1, resultando na fosforilação e ativação do fator IFN-regulatório-3 (IRF-3). Este, por sua vez, transloca-se para o núcleo onde se liga a regiões específicas do DNA para a produção das citocinas TNF- α (de modo independente do NF- κ B) e IFN- β (Sato *et al.*, 2003; Meylan *et al.*, 2004).

Existem moléculas acessórias extracelulares que auxiliam tanto no reconhecimento do PAMP pelos TLRs quanto na iniciação da transdução do sinal intracelular. O reconhecimento do LPS pelo TLR-4 é complexo e necessita de pelo menos três moléculas extracelulares acessórias: a proteína LBP, o receptor CD14 e a proteína MD-2. O LPS se liga primeiramente à proteína sérica LBP, que por sua vez, transfere o LPS ao CD14, que é um receptor sensível a LPS, expresso na superfície celular. O MD-2 é expresso na superfície celular em associação com o domínio LRR do TLR-4. Há evidências que o TLR-4 pode interagir diretamente com o LPS, mas o reconhecimento exercido pelo receptor é mais eficiente com a ajuda principalmente de CD-14 e de MD-2 (Lien *et al.*, 2000). CD14 também está envolvido no reconhecimento do LPS pelo TLR-2 e no reconhecimento viral pelo TLR-3, ligando-se ao dsRNA viral intracelular (Schimitz & Orso, 2002; Lee *et al.*, 2006).

3.3. TLRs e resposta imune celular e humoral

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno importantes no processo de diferenciação e ativação de células T (Itano & Jenkins, 2003) e são uma das células imunes que expressam TLRs, os quais estão relacionados com a indução da maturação e ativação destas células. Quando estes receptores são ativados pela presença da infecção, as células dendríticas imaturas são submetidas ao processo de maturação e ativação, ocorrendo subsequente expressão de moléculas co-estimulatórias e de MHC. Posteriormente, elas induzem a ativação das células T CD4+, diferenciando-as em células Th1 ou Th2 efectoras (Medzhitov *et al.*, 1997). Deste modo, a ativação das células dendríticas pelos TLRs, pode levar a resposta imune humoral ou celular.

Além de atuar na expressão de moléculas co-estimulatórias, os TLRs são responsáveis por induzir a produção de citocinas e quimiocinas pelas células dendríticas. Um exemplo importante é a produção de IL-12, que direciona as respostas das células para o padrão Th1 (Pasare & Medzhitov, 2004). Os TLRs também podem atuar sobre as células dendríticas indiretamente, uma vez que ligantes microbianos podem ativar TLRs de outras células, induzindo-as a produzir citocinas que promovam a maturação das células dendríticas (Kapsenberg, 2003).

Um modo de demonstrar a contribuição dos TLRs na indução da maturação das células dendríticas é feito através da utilização de camundongos *knockout* para MyD88, uma vez que a deleção desta proteína adaptadora pode inibir a transdução de sinal da maioria dos TLRs (Takeda *et al.*, 2003). Schnare *et al.* (2001) sensibilizaram estes animais com vários ligantes de TLRs, o que resultou em deficiência na ativação de células T e na produção de IFN- γ . Já em animais normais, houve aumento significativo na ativação destas células. Além do MyD88, o TRIF também pode exercer papel importante na ativação de células dendríticas, macrófagos peritoneais e na produção de IL-6, TNF- α e, em especial, IFN- β (Shen *et al.*, 2008).

Além da indução da resposta padrão Th1, há evidências de que a ativação das células apresentadoras de antígeno também pode atuar diretamente na diferenciação das células TCD4⁺ em células padrão Th2 via ativação de TLRs. As células Th2 estão envolvidas na resposta imune humoral, uma vez que levam a produção de anticorpos e agem contra infecção por parasitas (MacLeod & Wetzler, 2007). Ademais, ligantes de TLRs podem induzir diretamente a proliferação de células B e secreção de anticorpos por estas células tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Krieg *et al.*, 1995). Pasare & Medzhitov (2005) observaram que a produção de IgM e de IgG1 foi realizada através da ativação de TLR-4 em camundongos imunizados com OVA juntamente com LPS. Estes autores observaram também que uma resposta efetiva mediada por célula B requer tanto o envolvimento de células T quanto a ativação de TLRs. Já Heer *et al.* (2007) observaram que em camundongos infectados com o vírus influenza, TLR-7 induziu atividade proliferativa e produção de IgG1 por células B, além de induzir produção de IFN tipo I anti-viral por células dendríticas ativadas.

Camundongos deficientes para MyD88 também foram analisados quanto a sua resposta imune humoral. Schnare *et al.* (2001) observaram que estes animais apresentaram a mesma capacidade de produção de IgG1 e de IgE por células B do que

camundongos normais, sugerindo que os TLRs podem induzir a resposta imune padrão Th2 efetora de modo dependente da ativação do MyD88.

Apesar de haver um número considerável de trabalhos que investiguem os efeitos dos TLRs na resposta imune celular e humoral, os mecanismos envolvidos ainda carecem de maiores investigações.

3.4. TLRs e doenças

Estudos têm relatado que os TLRs também estão relacionados ao desenvolvimento de doenças devido a alterações na função ou na estrutura destes receptores, podendo resultar em maior susceptibilidade a infecções.

Desordens nas vias de sinalização podem levar ao desenvolvimento de doenças. Pacientes com deficiência em IRAK-4, por exemplo, são predominantemente susceptíveis a infecções bacterianas. Por outro lado, podem ser resistentes a infecções virais, uma vez que a produção de citocinas com atividades antivirais como IFN- α/β permanece inalterada devido a sinalização independente de IRAK-4 realizada pelo TLR-3 e TLR-4 (Yang *et al.*, 2005). Também tem sido relatado que variações genéticas (polimorfismos) em TLRs levam a alteração no reconhecimento destes receptores contra os patógenos, aumentando assim a susceptibilidade à doenças infecciosas. Foi observado que polimorfismos em TLR-5 diminuem significativamente a ativação deste receptor contra *Legionella pneumophila* (Gagro *et al.*, 2004). Já mutações em TLR-4 foram associadas com crescente severidade da bronquite infantil causada pelo vírus sincicial respiratório humano (Hawn *et al.*, 2006).

A ativação dos TLRs, em certas condições, pode levar a injúrias teciduais e doenças inflamatórias crônicas. Isso ocorre devido à exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Papadimitraki *et al.*, 2007). Sharif *et al* (2009) observaram que camundongos *knockout* para TLR-4 e CD-14 apresentaram menor desenvolvimento de pancreatite do que animais normais.

Tem sido observado que TLRs podem ser ativados por ligantes do próprio organismo, levando a doenças autoimunes. Esta ativação é causada, em especial, em caso de excessiva morte celular (como em injúria tecidual ou apoptose celular), onde há liberação de produtos celulares que, se não forem eficientemente eliminados, podem ser reconhecidos por TLRs. Por exemplo, derivados de ácidos nucleicos presentes nos corpos apoptóticos são interiorizados pelas células autoimunes e reconhecidos por

receptores intracelulares como o TLR-3 e TLR-9 (Rifkin *et al.*, 2005). Tal reconhecimento de produtos nucleicos é bem característico em pacientes com lupus eritematoso sistêmico (LES), os quais possuem alta concentração de anticorpos anti-DNA séricos, produzidos por células B autoreativas ativadas por TLRs (Arbuckle *et al.*, 2003).

Além dos ácidos nucleicos, outros produtos liberados por células mortas (e reconhecidos como autoantígenos pelos TLRs) são os produtos de matriz extracelular, como o fibrinogênio, além da presença de proteínas do choque térmico (HSPs). Pacientes com artrite reumatóide, apresentaram alta expressão de TLRs em células do tecido sinovial, o que foi relacionado com a presença dos produtos celulares liberados provindos de células mortas, aumentando ainda mais o grau de inflamação da doença (Rifkin *et al.*, 2005). Também foi observado que camundongos deficientes em TLR-2 apresentaram redução da severidade da artrite (Joosten *et al.*, 2003).

De acordo com estas observações, nota-se que o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas pode ser devido a disfunções na atividade e estrutura destes receptores. Ademais, defeitos nos processos regulatórios que inibem a ativação dos TLRs também são importantes no desenvolvimento destas doenças (Papadimitraki *et al.*, 2007).

3.5. Regulação da ativação dos TLRs

Em algumas condições, a ativação destes receptores necessita ser regulada. Esta regulação pode ocorrer durante o processo de transdução de sinal intracelular através de proteínas regulatórias citoplasmáticas (NOD 2, PI3 quinase, TOLLIP, A20, IRAK M e dnMyD88) ou transmembrânicas (ST2, SIGIRR e TRAIL-R), que inibem as proteínas adaptadoras ou quinases, as quais são importantes para as vias de sinalização. Ademais, há moléculas (como a TRIAD 3) que induzem a degradação de TLRs. Estes receptores também são capazes de induzir o processo apoptótico, prevenindo a reação inflamatória excessiva (Aliprantis *et al.*, 2000). Há também o papel das citocinas anti-inflamatórias (como IL-10 e TGF- β) que podem regular a expressão dos TLRs (Liew *et al.*, 2005).

Um outro meio de regulação dos TLRs é através das células T regulatórias (células Tregs). Estas células são importantes para a manutenção da tolerância periférica, protegendo o organismo contra doenças autoimunes, além de controlar a inflamação. São células T CD4⁺CD25⁺ e possuem um regulador de transcrição

denominado FOXP3 (Sakaguchi & Sakaguchi, 2005). Uma vez ativadas, suprimem a proliferação e a produção de citocinas por células CD4⁺ e CD8⁺ efetoras. A presença de TLRs nas células Treg tem feito com que pesquisadores correlacionem a ativação destes receptores à função de modular a inibição da resposta imune (Sutmuller *et al.*, 2006).

Foi observado que agonistas para TLR-5 aumentaram a supressão de células T por células Treg (Crellin *et al.*, 2005). Já camundongos deficientes em TLR-2 apresentaram significativa diminuição no número de células Treg, enquanto que a administração de ligantes para TLR-2 a animais normais reverteu este efeito (Sutmuller *et al.*, 2006). Deste modo, os ligantes de TLRs têm a capacidade de modular a resposta imune via células Treg, embora o mecanismo de ativação destas células através dos TLRs com conseqüente modulação dos seus efeitos imunossupressores ainda não seja totalmente conhecido. Uma possível explicação seria que os TLRs poderiam modular a expressão do FOXP3, uma vez que há trabalhos que indicam que estes receptores podem regular tanto positiva quanto negativamente a expressão de FOXP3, afetando assim, a atividade destas células. Ademais, TLR-2 pode induzir células T efetoras a produzir IL-2, liberando-as da supressão causada pelas Tregs (Liu *et al.*, 2006). Também foi observado que células dendríticas ativadas por TLRs podem produzir citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, controlando assim a atividade supressora das Tregs (Pasare & Medzhitov, 2003; Fehérvári & Sakaguchi, 2004). Como já foi anteriormente mencionado, a resposta do organismo frente ao estímulo do agente estressor leva a ativação do eixo HPA, resultando assim na liberação de glicocorticóides. Estes hormônios têm sido intensamente estudados ao longo dos anos devido as suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Também se sabe que estes hormônios podem alterar a atividade das células imunes através de receptores.

Os TLRs estão presentes em células imunes e, quando ativados, levam a produção de citocinas e quimiocinas responsáveis pela resposta inflamatória. Assim, devido a estas observações e também devido a importância destes receptores na defesa do organismo contra agentes patogênicos, estudiosos recentemente tem investigado a ação dos glicocorticóides sobre os TLRs.

A interação entre os TLRs e PAMPs leva a vias de sinalização as quais são realizadas por intermédio de proteínas adaptadoras, resultando na ativação de fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1 e IRF), que por sua vez, induzem a transcrição gênica de mediadores os quais induzem a atividade inflamatória de células imunes (West *et al.*,

2006). No entanto, uma das ações anti-inflamatórias mediadas pelos glicocorticóides é realizada entre o hormônio e o seu receptor (GC) nuclear, que, juntos, interagem com estes fatores de transcrição inflamatórios, inibindo assim a sua ligação com o DNA e a subsequente produção de citocinas, afetando, deste modo, a atividade das células imunes (Riccardi *et al.*, 2002).

As MAP quinases (MAPKs) também são importantes no processo de transcrição de genes pró-inflamatórios, uma vez que medeiam vias de sinalização que levam a ativação de fatores de transcrição como o AP-1. As MAPKS também são alvos para a ação dos glicocorticóides. Lasa *et al.* (2001) observaram que MAPKs como JNK e p38 têm a sua expressão inibida por dexametazona. Também foi observado que a inibição de JNK pelos glicocorticóides pode inibir a produção de TNF induzida pelo LPS, fazendo com que seja aparente a inibição destes hormônios sobre a sinalização do TLR-4 (Swanek *et al.*, 1997; Moynagh, 2001).

Além da inibição dos fatores de transcrição pró-inflamatórios, estes hormônios também podem exercer seus efeitos inibitórios por meio da via de sinalização dos TLRs, induzindo moléculas supressoras (Chinenov & Rogatzsky, 2007). Como exemplo, tem sido relatado que os glicocorticóides podem induzir a transcrição de mRNA da proteína SOCS1, a qual tem a função de degradar o domínio intracelular TIR (Mansell *et al.*, 2006). Ademais, os glicocorticóides induzem a expressão da fosfatase-1, a qual é responsável por exercer efeito de feedback negativo sobre as MAPKs (Abraham & Clark, 2006).

Por outro lado, tem-se observado que os glicocorticóides podem aumentar a expressão de mRNA de TLRs como TLR-2 e TLR-4 em vários tipos celulares. Em células de carcinoma cervical, a baixa expressão de TLR-2 é significativamente aumentada sob exposição a LPS de bactéria gram-negativa, mas foi potencializada após tratamento com glicocorticóides (Imasato *et al.*, 2002). Já Bornstein *et al.* (2004) evidenciaram aumento da expressão de TLR-2 e TLR-4 em células da adrenal humanas e murinas após serem expostas a LPS e LTA. No entanto, em células dendríticas, os glicocorticóides induziram a expressão destes receptores, mas inibiram a produção de TNF- α e IL-12 em resposta a agonistas de TLR (Rozkova *et al.*, 2006). Deste modo, os glicocorticóides inibiram a atividade destas células ao mesmo tempo em que induziram a expressão de TLRs. Assim, verifica-se que os mecanismos pelos quais estes hormônios atuam sobre os TLRs ainda necessitam ser esclarecidos.

A diminuição da ativação dos TLRs através da ação anti-inflamatória dos glicocorticóides interfere na fase inicial de reconhecimento e detecção de patógenos na resposta imune celular, além de também prejudicar a indução da resposta imune humoral, uma vez que os TLRs são importantes na expressão de moléculas co-estimulatórias em células apresentadoras de antígeno (Medzhitov *et al.*, 1997). Por outro lado, a regulação negativa destes receptores pode ser importante contra doenças autoimunes e inflamatórias.

3.6. TLRs e seus efeitos durante o estresse

O estudo sobre os efeitos imunossupressores do estresse e as investigações de como minimizar ou até mesmo impedir estes efeitos têm sido cada vez mais realizados, uma vez que inúmeras doenças têm sido relacionadas com o estresse. Ademais, como um dos principais efeitos negativos do estresse é o favorecimento de maior susceptibilidade a doenças infecciosas, e considerando que os TLRs estão presentes nas células imunes com a função de induzir resposta imune contra patógenos, pesquisadores têm dedicado especial atenção na atividade destes receptores no sistema imunológico de organismos submetidos a estresse, a fim de observar se estes receptores poderiam restabelecer a atividade das células imunes contra a inibição induzida pelo estresse.

Gopal *et al.* (2008) observaram que camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* apresentaram aumento na expressão de TLR-2/4/9 e 11 em células do epitélio intestinal, mas as expressões foram significativamente inibidas quando os animais foram submetidos a estresse por exposição à água fria. Estes autores demonstraram que esta inibição ocorreu devido à ação da norepinefrina, hormônio liberado durante o estresse, além de aumento na proteína reguladora da expressão de TLRs. O estresse também exerceu efeito negativo na expressão de TLR-2 e TLR-4 e inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) em células do sangue periférico de indivíduos sob estresse pós-operatório, mesmo após estímulo por LPS (Ikushima *et al.*, 2004).

Por outro lado, Bailey *et al.* (2007) verificaram a atividade de TLRs em animais submetidos a estresse social e infectados com *Escherichia coli*. Os animais estressados tiveram aumento na expressão de TLR-2 e de TLR-4 por células esplênicas, em comparação ao grupo controle. Além disso, estes animais também apresentaram maior ativação dos macrófagos esplênicos (verificado através de maior expressão de

células co-estimulatórias, e produção de NO), o que explicaria o aumento dos receptores durante o estresse. A infecção, por sua vez, foi mais inibida nos animais sob estresse. Os autores sugeriram que estes efeitos seriam possíveis devido a mecanismos de resistência aos glicocorticóides, uma vez que já foi observado que MAPKs (em especial a p38) podem interferir na translocação do GR para o núcleo (Pariante *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004), impedindo os efeitos inibitórios dos glicocorticóides sobre as células imunes. Também foi sugerido que AP-1, em altas concentrações, possa exercer efeito negativo nas ações nucleares deste hormônio e seu receptor (Leung & Bloom, 2003).

No entanto, há indícios de que a presença de TLRs em animais estressados possa potencializar os efeitos imunossupressores do estresse. Foi verificado que estresse por imobilização pode modular o sistema imune através de TLRs (Shi *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2006). Zhang *et al.* (2008) verificaram que camundongos estressados por imobilização e *knockout* para TLR-4 apresentaram atenuação do desequilíbrio entre a produção de citocinas padrão Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4) proporcionado pelo estresse em camundongos normais. Ademais, neste mesmo trabalho, estes autores também observaram que este desequilíbrio foi inibido via PIK3 - inibidor de TLR-4.

Através destes dados, é realmente intrigante como os TLRs podem exercer diferentes efeitos durante o estresse, levando a obtenção de resultados discrepantes. É importante salientar que os mecanismos exatos da ativação dos TLRs e os efeitos do estresse (em especial dos glicocorticóides) sobre estes receptores ainda não estão completamente compreendidos, o que dificulta a explicação da discrepância destes eventos. Também não podemos ignorar que o estresse é um evento complexo, no qual ocorre a participação de diferentes sistemas do organismo, além de citocinas e neurotransmissores os quais podem influenciar a atividade das células imunes, interferindo em suas respostas.

Nosso grupo de pesquisa tem realizado trabalhos visando investigar a relação própolis-estresse, a fim de observar o possível efeito deste produto natural em amenizar ou até mesmo inibir a imunossupressão induzida pelo estresse, uma vez que a própolis é um produto natural provido de ação imunomoduladora. Através do presente projeto de Mestrado, nosso grupo de pesquisa teve o interesse de investigar se própolis poderia influenciar a expressão dos TLRs em animais submetidos a estresse, visto que diferentes produtos naturais podem modular a ação destes receptores. Como exemplo, animais estressados e tratados com ginseng - produto natural com atividade imunoestimulante (Rasheed *et al.*, 2008), apresentaram aumento na expressão de TLR-4 e na produção de

citocinas pró-inflamatórias por macrófagos peritoneais (Pannacci *et al.*, 2006). O presente projeto é de extrema importância, uma vez que não há dados na literatura que demonstrem o papel da própolis sobre receptores celulares e produção de citocinas em organismos estressados.

Objetivos

Objetivo Geral:

Investigar a ação imunomoduladora da própolis em camundongos submetidos a estresse, analisando a produção da citocinas e a expressão do receptor TLR-4.

Objetivos Específicos:

- Determinar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6), de perfil Th1 (IL-2 e IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10) no sobrenadante de cultura de esplenócitos totais por animais submetidos a estresse;
- Avaliar a expressão do receptor TLR-4 por esplenócitos totais;
- Verificar o possível papel imunomodulador da própolis, em relação a estes parâmetros imunológicos, em animais submetidos a estresse;
- Avaliar a concentração sérica de corticosterona nos grupos experimentais, como um indicador de estresse.

Capítulo 1

Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice

Trabalho a ser submetido à revista *Immunology Letters*

Ana Carolina Pagliarone, Fabiane Missima, Cláudio Lera Orsatti, Tatiana Fernanda Bachiega, José Maurício Sforcin*

Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 14 3811 6058; fax: +55 14 3811 6058 236.

E-mail address: sforcin@ibb.unesp.br (J. M. Sforcin)

ABSTRACT

Propolis has gained special attention due to its biological properties such as immunomodulatory, antitumoral, antibacterial, anti-inflammatory, among others. However, little is known about its immunomodulatory effects in stress conditions. The purpose of this study was to investigate propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by spleen cells of acutely stressed mice. Serum corticosterone concentration was determined as a stress indicator. Regarding Th1 cytokines production, no alterations were seen in IL-2 production; however, IFN- γ production was inhibited in stressed mice, even when treated with propolis. As to Th2 cytokines, IL-4 was inhibited in stressed mice, but normal levels were seen when these animals were treated with propolis. No significant differences were found in IL-10 production between the

experimental groups. Stressed groups (treated or not with propolis) showed higher corticosterone concentrations in comparison to control group. Data suggest that propolis treatment was not able to counteract the stress-induced immunosuppressive effect on IFN- γ production; however, propolis showed an immunorestorative role, increasing IL-4 production in stressed mice, favoring humoral immune response during stress. Since the exact mechanisms of this natural product on immune system are still unclear, further studies are still required for a better comprehension of propolis use as a therapeutic alternative against the stress-induced negative effects that could lead to the development of various diseases.

Keywords:

Propolis

Stress

Th1/Th2 cytokines

Immunomodulation

1. Introduction

Propolis is a resinous and adhesive substance collected by honeybees from exudates and leaf buds from various plant sources [1]. This product has important functions in the hive, since it can be used to seal holes in their honeycombs and to protect against intruders and microorganisms [2,3].

In general, propolis is composed by 50% resins and balsams, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen and 5% various other substances, including organic debris [2]. The chemical analysis of our propolis sample by gas-

chromatography (GC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and thin layer chromatography (TLC) revealed that its main components are phenolic compounds (flavonoids, aromatic acids, benzopyranes), di- and triterpenes, essential oils, among others. Seasonal variations in propolis composition are not significant and are predominantly quantitative [4,5]. The main vegetal source of propolis in Botucatu, São Paulo State, Brazil, is *Baccharis dracunculifolia* D.C., followed by *Eucalyptus citriodora* Hook and *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze [6].

Used for medicinal purposes since ancient times, this natural product has shown to possess many biological properties, including antibacterial [7,8], antiviral [9], anti-inflammatory [10], antifungal [11], antitumoral [12], antiparasite [13], immunomodulatory [14], among others. Nevertheless, its immunomodulatory action in stressed mice deserves investigation.

Stress is the condition where the organism homeostasis is disturbed as a result of the action of stressor agents. Stress responses involve a bi-directional relation between the neuroendocrine and the immune systems [15], with activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and of the sympathetic nervous system (SNS), resulting in the production of glucocorticoids and catecholamines, respectively [16]. The dysfunctional activation of the HPA axis and of the SNS can exert critical alterations in immune responses, leading to development of diseases such as cancer, infections by microorganisms, autoimmune dysfunctions, among others [17,18]

Glucocorticoids are considered the main responsible for the immunosuppressive role of stress. These hormones can regulate immune processes, such as cell proliferation, and inflammation; however, in higher concentrations, they can induce apoptosis in mature T and B cells and inhibit the trafficking of T, B and NK cells [19]. Besides, high concentrations of glucocorticoids lead to dysregulation of the Th1/Th2

cytokine profile, inhibiting the production of IL-2 and IFN- γ by Th1 cells and inducing IL-4 and IL-10 production by Th2 cells, suppressing cellular immunity and stimulating the humoral immune response [20].

Although propolis possesses immunomodulatory action, little is known about its role against the stress-induced negative effects on the immune system. Thus, the aim of this work was to investigate propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by spleen cells from acutely stressed mice.

2. Material and Methods

2.1. Propolis hydroalcoholic solution

Propolis was produced by Africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) in the apiary located on Lageado Farm, UNESP, Campus of Botucatu, SP, Brazil, and collected using plastic nets. Samples were subsequently frozen to promote propolis removal from the nets. Afterwards, propolis was ground and a 30% propolis ethanol extract was prepared (30g of propolis added to a 70% ethanol solution totaling 100 mL), in the absence of bright light, at room temperature and shaken moderately [21]. After a week, extracts were filtered and final concentrations were calculated, obtaining the dry weight of the solutions (120 mg/mL). Specific dilution was done to determine the concentration of propolis solution to be given to the animals (200 mg/kg).

2.2. Animals and stress procedures

BALB/c male mice aged 8-12 weeks were housed at room temperature (22-24°C) and 12h /12h light-dark cycle for a week before the beginning of experimental procedures. Mice had free access to standard rodent chow and water. Animal procedures were done according to Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA – 25/05/07).

Mice were stressed by restraint in an immobilization conical tube of 50 mL (restrainer) with ventilation holes for 3 consecutive days, increasing the immobilization period (30 min, 1h and 2h, respectively). All stress procedures occurred at 8:00 a.m. and control group had no access to water and food during stress sessions.

2.3. Experimental groups

Mice were randomly divided into 3 groups (G1, G2 and G3), with 8 animals each. G1 was considered control, and G2 was submitted to restraint stress. Both G1 and G2 received physiological solution (NaCl 0.9%, 0.1mL) by gavage before stress sessions. G3 was treated with propolis (200 mg/kg/day, 0.1 mL, by gavage) and was immediately submitted to stress. All animals were sacrificed in the third day, immediately after stress procedure.

2.4. Corticosterone determination

Animals were sacrificed using a CO₂ inhalation chamber. Blood of all experimental groups was obtained by cardiac puncture and serum was used for corticosterone determination by radioimmunoassay, using commercial kit and following

the manufacturer's instructions (Coat-A-count®Rat Corticosterone, Siemens, Los Angeles, CA).

2.5. Spleen cells cultures and cytokines determination

After sacrifice, spleens were aseptically removed and cells were suspended at a concentration of $5 \times 10^6/\text{mL}$ in RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% L-glutamine and cultured in flat-bottomed 24-well plates. Cells were cultured in triplicates (1 mL/well) and stimulated with concanavalin A (Con A – 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48h and 5% CO_2 .

Supernatants of spleen cell cultures were collected and assayed for Th1 (IL-2 and IFN- γ) and Th2 (IL-4 and IL-10) cytokines determination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Diego, USA). Briefly, a 96-well flat bottom Maxisorp (Nunc, USA) was coated with capture antibody specific to each cytokine. The plate was washed and blocked before 100 μL of the supernatants and serially diluted specific standards were added to the respective wells. Following a series of washing, the captured cytokine was detected using the specific conjugated detection antibody. The chromogen/substrate reagent was added into each well and, after color development, the plate was read at 450 nm, using an ELISA plate reader [22].

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed with Graph Pad statistical software (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey-Kramer test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Corticosterone levels (stress indicator)

Fig. 1 shows that stressed mice produced significant higher corticosterone concentrations in comparison to control group ($P < 0.001$). Propolis treatment of stressed mice induced higher corticosterone levels in comparison to the stress group ($P < 0.001$).

3.2. Th1/Th2 cytokines production

With regard to Th1 cytokines production, no significant differences were seen in IL-2 basal production (Fig. 2A) or in Con A-stimulated spleen cells (Fig. 2B). However, both IFN- γ basal and Con A-stimulated production (Figs. 3A and 3B, respectively) were inhibited in stressed mice comparing to control ($P < 0.01$), even when treated with propolis ($P < 0.001$).

With respect to Th2 cytokines, IL-4 basal production was not detected. In Con A-stimulated cultures, stress inhibited significantly IL-4 production by spleen cells ($P < 0.01$ – figure 4), comparing to control group. This inhibition was not observed when stressed mice were treated with propolis ($P < 0.001$). On the other hand, there were no significant differences in IL-10 basal production between the experimental groups (Fig. 5A) even in mitogen- stimulated spleen cells (Fig. 5B).

4. Discussion

Several researchers have demonstrated propolis' immunomodulatory activity, but little is known about its effects on the immune system during stress conditions. Thus, our research group has been investigating the relationship “propolis-stress-immunity” [21,23,24].

The restraint stress procedure is an experimental model that is not painful and the animal is not physically compressed, but the sensation of immobilization is enough to induce psychological stress. In addition, both SNS and HPA axis are activated, resulting in increased levels of catecholamines and corticosterone, respectively [25]. Our data are in agreement with these observations, since elevated levels of corticosterone were seen in stressed mice, treated or not with propolis, evidencing that the acute stress was able to activate the HPA axis.

CD4⁺ T helper (Th) cells can be functionally differentiated in Th1 and Th2 cells, according to their cytokine profile production [26]. Th1 cells secrete mainly IFN- γ and IL-2 and inhibit Th2 cells proliferation. In contrast, Th2 cells secrete mainly IL-4 and IL-10, and inhibit Th1 cells. Th1 activation contributes to cell-mediated immunity whereas Th2 activation favors the humoral immune response [27,28], and Th1/Th2 balance is a prerequisite for the functionality of immune system against infections. Many studies have demonstrated that stress leads to the dysfunction of Th1/Th2 balance, since glucocorticoids may inhibit the production of IL-2 and IFN- γ by Th1 cells and upregulate IL-4, IL-10 and IL-13 production by Th2 cells. Thus, it is proposed that stress induces cellular immunity suppression without affecting humoral immune response [20, 29,30].

In order to investigate if acute restraint stress for 3 consecutive days would lead to Th1/Th2 imbalance, supernatant of spleen cells were used to measure Th1 (IFN- γ and IL-2) and Th2 (IL-4 and IL-10) cytokine production. In addition, it was investigated a possible immunomodulatory effect of propolis on these cytokines production during stress. With respect to Th1 cytokines, it was observed that stress did not alter IL-2 production by spleen cells, even when stressed mice were treated with propolis. It has been verified that propolis may inhibit IL-2 production by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro* [31]. On the other hand, stressed mice (treated or not with propolis) showed a significant inhibition in IFN- γ production by spleen cells. Experimental works of our group, submitting C57BL/6 mice to chronic restraint stress for 14 consecutive days, also evidenced an inhibition in IFN- γ production, even when these animals were treated with propolis (unpublished data). IFN- γ inhibition may occur due to high corticosterone levels produced by both stressed groups, since the negative action of glucocorticoids on IFN- γ production has been widely reported by other authors [26,32]. As a consequence, IFN- γ inhibition may reduce natural killer cells number and activity, leading to a higher susceptibility to infectious diseases and cancer development [16,33]. Thus, according to our data, propolis treatment was not able to antagonize IFN- γ inhibition in stressed mice.

With regards to Th2 cytokines, stressed mice showed a significant inhibition in IL-4 production. Inhibitory effects of glucocorticoids on IL-4 production were previously reported [34,35]. However, propolis treatment counteracted these stress effects, stimulating IL-4 production similar to control levels. Several authors have shown that propolis or some isolated compounds may activate the humoral immunity, stimulating antibody production [36,37]. No alterations were seen in IL-10 production. It has been observed that propolis inhibited both IL-4 and IL-10 production by human

PBMC or T cells *in vitro* [31]. Propolis inhibited IL-10 production by BALB/c mice submitted to experimental asthma model [10].

Although it is considered that stress can lead to Th1/Th2 imbalance by upregulating the Th2 response, it depends on stress conditions. Our results showed that stress could inhibit both IFN- γ and IL-4 production, with no significant alterations in IL-2 and IL-10 levels. Moreover, it has been widely demonstrated that immune dysfunctions may vary according to intensity, type and duration of stress [38,39]. Inhibition of Th1 and Th2 cytokines was also observed in major depressive disorder patients that showed low IFN- γ , IL-2 and IL-4 production [40]. On the other hand, distinct results were observed in chronic pain-stressed patients: subjects with complex regional pain syndrome showed Th1/Th2 imbalance, while the ones with fibromyalgia showed no significant differences in Th1/Th2 cytokines production by immune blood cells [41].

Based in our findings, one may conclude that propolis treatment was not able to antagonize the stress-induced inhibition on IFN- γ production in acutely stressed mice. However, this natural product totally recovered IL-4 production by spleen cells, playing an important immunorestorative role, since stress may lead to high susceptibility to infectious diseases and humoral immunity is extremely important to host defense against infections by extracellular microorganisms. Further studies are still needed in order to analyze the potential of this natural product as a therapeutic alternative against the immune dysfunctions caused by stress.

Acknowledgements

Authors wish to thank FAPESP (2007/02692-6) and CAPES (199-01/2007) for the financial support.

References

- [1] Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:29-32.
- [2] Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998;36:347–363.
- [3] Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001;15:561–571.
- [4] Boudourova-Krasteva G, Bankova V, Sforcin JM, Nikolova N, Popov S. Phenolics from Brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1997;52c:676–679.
- [5] Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 1998;29:361–367.
- [6] Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, et. al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z. Naturforsch* 1999; 54c:401-405.
- [7] Sforcin JM, Fernandes Jr. A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000;73:2443-2249.
- [8] Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Fernandes Jr. A, Bankova V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. *Braz J Microbiol* 2006;37:108–112.

- [9] Gekker G, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR, Peterson PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol* 2005;102:158–163.
- [10] Sy LB, Wu YL, Chiang BL, Wang YH, Wu WM. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Int Immunopharmacol* 2006;6:1053-1060.
- [11] Fernandes FF, Dias AL, Ramos CL, Ikegaki M, Siqueira AM, Franco MC. The “*in vitro*” antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2007; 49:93-95.
- [12] Orsolic N, Saranovic AB, Basic I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med* 2006;72:20–27.
- [13] Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimarães S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 2006;13:170-175.
- [14] Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007;113:1-14.
- [15] Safieh-Garabedian B, Poole S, Haddad JJ, Massaad CA, Jabbur SJ, Saadé NE. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology* 2002;42: 864-872.
- [16] Marketon JJ, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol* 2008;252:16-26.
- [17] De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. Prolactin and autoimmunity. *Pituitary* 2005; 8:25-30.
- [18] Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front Neuroendocrinol* 2007;28:28-49.

- [19] Riccardi C, Bruscoli S, Migliorati G. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol Res* 2002;45:361-368.
- [20] Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:359-368.
- [21] Sforcin JM, Missima F, Orsatti CL, Pagliarone AC, Kaneno R. Propolis effect on Th1/Th2 cytokine profile in melanoma-bearing mice submitted to stress. *Scand J Immunol* 2008;68:216-217.
- [22] Tan EL, Selvaratnam G, Kananathan R, Sam CK. Quantification of Epstein-Barr virus DNA load, interleukin-6, interleukin-10, transforming growth factor- β 1 and stem cell factor in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 2006;6:227.
- [23] Missima F, Sforcin JM. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs in chronically stressed mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008;5:71-75.
- [24] Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Sforcin JM. Propolis effect on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. *J ApiProd ApiMed Sci* 2009; 1: 11-15.
- [25] Gadek-Michalska A, Spycka J, Bugajski J. Psychosocial stress affects the involvement of prostaglandins and nitric oxide in the lipopolysaccharide-induced-hypothalamic-pituitary-adrenal response. *J Physiol Pharmacol* 2005;56:287-298.
- [26] Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000;52:595-638.

- [27] Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, *et al.* Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001;292:1907-1910.
- [28] Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P, Ray A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 2001;500:45-50.
- [29] Petrovsky N. Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction. *Immunol Cell Biol* 2001;79:350-357.
- [30] Elenkov IJ. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1024:138-146.
- [31] Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z Naturforsch* 2003;58:580-589.
- [32] Webster JJ, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:125-163.
- [33] Kemeny ME, Schedlowski M. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression. *Brain Behav Immun* 2007;21:1009-1018.
- [34] Bradding P, Feather IH, Wilson S, Holgate ST, Howarth PH. Cytokine immunoreactivity in seasonal rhinitis: regulation by a topical corticosteroid. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1900-1906.
- [35] Bentley AM, Hamid Q, Robinson DS, Schotman E, Meng Q, Assoufi B, *et. al.* Prednisolone treatment in asthma: reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and

interferon- γ cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:551–556.

- [36] Park JH, Lee JK, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Kim KA, et. al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* 2004;4:429-436.
- [37] Sforcin JM, Bankova V, Orsi RO. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plants on antibody production. *J Ethnopharmacol* 2005;98:301-305.
- [38] Bielajew C, Konkle ATM, Merali Z. The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res* 2002;136:583-592.
- [39] Pruett SB. Stress and the immune system. *Pathophysiology* 2003;9:133-153.
- [40] Kim YK, Na KS, Shin KH, Jung HY, Choi SH, Kim JB. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:1044-1053.
- [41] Kaufmann I, Eisner C, Richter P, Hüge V, Beyer A, Chouker A, et. al. Lymphocyte subsets and the role of Th1/Th2 balance in stressed chronic pain patients. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:272-280.

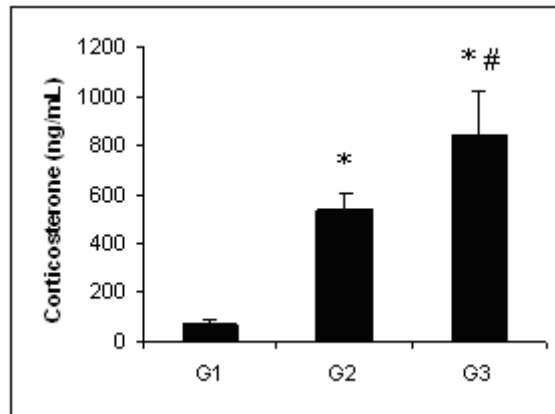


Fig. 1. Serum corticosterone concentration (ng/mL). G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as means and standard-deviation (n = 8). * significantly different from control ($P < 0.001$); # significantly different from stress ($P < 0.001$).

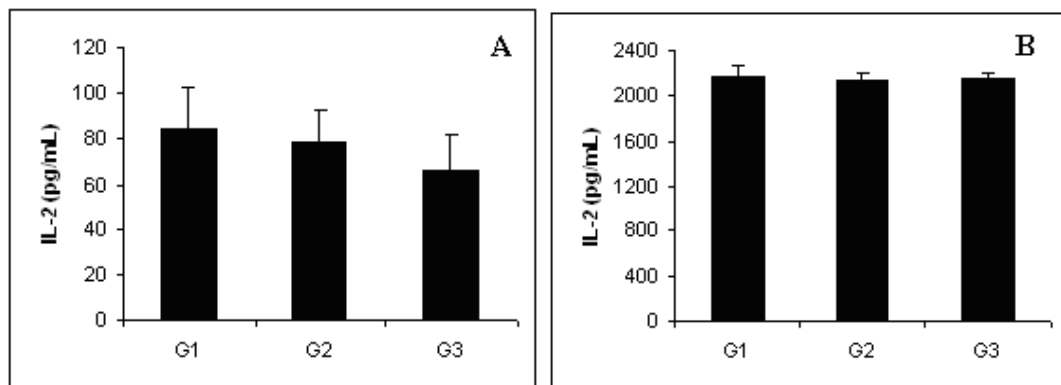


Fig. 2. IL-2 production (pg/mL) by spleen cells. (A) basal; (B) stimulated with Con A (10 μ g/mL) for 48 h. G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as mean and standard-deviation (n = 8).

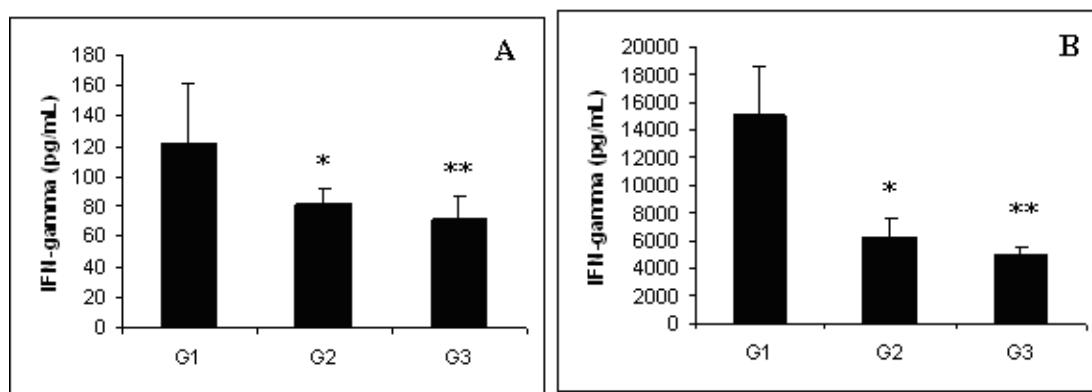


Fig. 3. IFN- γ production (pg/mL) by spleen cells. (A) basal; (B) stimulated with Con A (10 μ g/mL) for 48 h. G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as mean and standard-deviation (n = 8). * significantly different from control ($P < 0.01$); ** significantly different from control ($P < 0.001$).

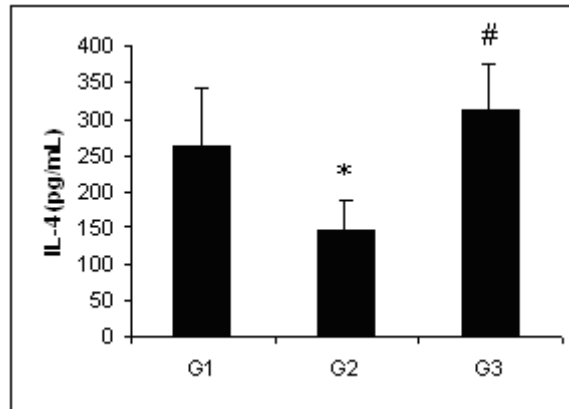


Fig. 4. IL-4 production (pg/mL) by spleen cells stimulated with Con A (10 μ g/mL) for 48 h. G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as mean and standard-deviation (n = 8). * significantly different from control ($P < 0.01$); # significantly different from stress ($P < 0.001$).

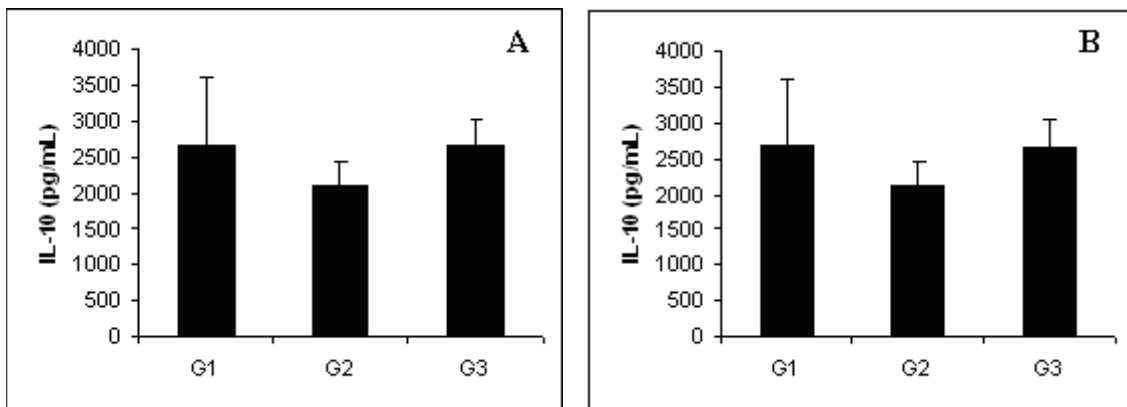


Fig. 5. IL-10 production (pg/mL) by spleen cells. (A) basal; (B) stimulated with Con A (10 μ g/mL) for 48 h. G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as mean and standard-deviation (n = 8).

Capítulo 2

**Propolis effect on pro-inflammatory cytokines production and TLR-4 expression
by stressed mice**

Trabalho a ser submetido à revista *Immunology & Cell Biology*

Ana C. Pagliarone, Michelle C. Bufalo, Fabiane Missima, Cláudio L. Orsatti, Tatiana F. Bachiega, João P. Araújo Jr. and José M. Sforcin

Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

Correspondence: Professor José M. Sforcin, Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil

E-mail: sforcin@ibb.unesp.br

Propolis is a natural product produced by bees and its immunomodulatory action has been well documented. However, little is known concerning its activity on the immune system of stressed mice. Thus, the aim of this work was to investigate a possible role of propolis against the immunosuppressive effects induced by stress in BALB/c mice, assessing the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) production and Toll-like receptor (TLR)-4 expression by spleen cells. Serum corticosterone levels were determined as a stress indicator. Stressed mice, treated or not with propolis, produced higher corticosterone levels as compared to control. IL-1 β and IL-6 production was significantly inhibited in stressed mice, treated or not with propolis. However, TLR-4 expression was decreased in stressed mice while no alterations were seen in propolis-treated mice. Glucocorticoids can suppress inflammatory cytokines production and regulate TLRs gene expression. Similarly, our data evidenced that the immunosuppressive effects on IL-1 β and IL-6 production and on TLR-4 expression by stressed mice might have occurred due to corticosterone production during stress. Propolis treatment of stressed mice did not antagonize the negative effects on pro-inflammatory cytokines production; nevertheless, it counteracted the TLR-4 inhibition in stressed animals. Since pro-inflammatory cytokines as well as TLR-4 expression are important events in the innate immunity to combat different pathogens, propolis exerted an important restorative action on TLR-4 expression by stressed mice, contributing to the recognition of microorganisms during stress. Further studies are required to a better understanding of propolis usefulness in stress-challenged mice.

Keywords: propolis; pro-inflammatory cytokines; stress; Toll-like receptor

INTRODUCTION

Stress may be defined as the state of threatened homeostasis due to the action of intrinsic or extrinsic disturbing factors (stressors). Stress responses comprise a complex relation between the endocrine, nervous and immune systems, with activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system (SNS), resulting in glucocorticoids and catecholamines production, respectively.¹ Immune cells are able to respond to the signals from HPA axis and SNS due to neuroendocrine and neuropeptide receptors in these cells.² Furthermore, it has been shown that lymphoid organs are innervated by sympathetic and parasympathetic nerves.³

Stress often leads to immunosuppression because glucocorticoids and catecholamines can affect different events of the immune response such as antigen presentation, traffic and proliferation of leukocytes, antibody and cytokines secretion.⁴ There are evidences that stressful conditions can lead to somatic disorders such as depression, high susceptibility to infections and cancer development⁵, and immune dysfunctions occur specially due to the high levels of glucocorticoids released during stress.²

The efficacy of natural products against stress-induced immunosuppression has received a remarkable attention in the last years.^{6,7} Our research group has been investigating propolis action on the immune system of stressed mice.⁸⁻¹⁰ Propolis is an adhesive substance collected by honeybees from the bud and exudates of certain trees and plants and stored inside their hives to protect the colony due to its antimicrobial properties.¹¹ The main vegetal source of propolis in Botucatu, São Paulo State, Brazil, is *Baccharis dracunculifolia* D.C., followed by *Eucalyptus citriodora* Hook and *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze.¹² This natural product has a complex chemical composition, and the analysis of our propolis sample revealed that its main

components are phenolic compounds (flavonoids, aromatic acids, benzopyranes), di- and triterpenes, essential oils, among others. Seasonal variations in propolis composition are not significant and are predominantly quantitative.^{13,14}

Used in folk medicine for centuries, works have shown that propolis possesses a broad spectrum of biological properties, such as anti-inflammatory,¹⁵ antibacterial,¹⁶ antifungal,¹⁷ antitumoral,¹⁸ antiviral,¹⁹ antioxidant,²⁰ immunomodulatory,²¹ among others. However, propolis mechanisms of action are not completely clear, mainly on the immune system of individuals submitted to the negative effects induced by stress.

Toll-like receptors (TLRs) are crucial for innate immunity response, since they recognize microbial products known as pathogen-associated molecular patterns. Thirteen TLRs have been identified in mice and humans.²² These transmembrane receptors are characterized by an exodomain with leucine-rich repeats (LRRs) and a cytoplasmic signaling domain termed Toll/IL-1R (TIR). The signaling pathways activated by TLR are mediated by cytosolic adaptor proteins recruited to the intracellular domain upon ligand binding.²³ Adaptor proteins such as MyD88, TIRAP/Mal, TRIF and TRAM induce a downstream signaling cascade culminating in NF- κ B and AP-1 activation and resulting in the transcription of several pro-inflammatory cytokines and chemokines.²⁴ Gram-negative bacteria lipopolysaccharide (LPS) is the major ligand recognized by TLR-4, showing the importance of this receptor on bacterial infections.²⁵ Although there are studies that investigate the propolis biological properties, there is no data about the effect of this natural product on these receptors.

Thus, this work evaluated the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) production and TLR-4 expression by spleen cells of restraint stressed mice, treated or

not with propolis, in order to investigate a possible immunomodulatory effect of propolis against stress-induced immunosuppression.

RESULTS

Corticosterone production was determined in order to investigate the HPA activation induced by restraint stress. According to the Figure 1, stressed mice showed a significant increased corticosterone production comparing to control group, even when treated with propolis ($P < 0.001$).

Because of propolis immunomodulatory action, we aimed to evaluate the role of this natural product on pro-inflammatory cytokines production and TLR-4 expression by spleen cells from stressed mice. According to our data, both IL-1 β and IL-6 basal production was not detected in the experimental groups. In LPS-stimulated cultures, one may observe that stressed mice produced lower levels of IL-1 β comparing to control group ($P < 0.01$), even when treated with propolis ($P < 0.01$) (Figure 2). Stress also inhibited IL-6 production by stressed mice ($P < 0.01$), even after propolis treatment ($P < 0.001$) (Figure 3). There were no significant differences in IL-1 β and IL-6 production between the stressed groups.

With regards to TLR-4 expression by spleen cells, an inhibited TLR-4 gene expression ($P < 0.05$) was found in stressed mice in comparison to control. However, propolis administration to stressed mice led to TLR-4 expression similar to control (Figure 4).

DISCUSSION

Stress-induced immunosuppression has been related to the development of diseases.²⁶ Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α are important to immune defense because of their crucial role against infections and injuries, leading to

activation/stimulation of macrophages and T lymphocytes, enhancement of chemokine gene expression and maturation of dendritic cells.²⁷

Our data revealed that stressed mice showed higher corticosterone levels comparing to control group, evidencing that restraint stress led to HPA activation. In addition, high corticosterone release was followed by decreased IL-1 β and IL-6 production, suggesting that the inhibition of pro-inflammatory cytokines probably occurred due to corticosterone immunosuppressive action. In non-stressed animals, propolis was able to activate macrophages and to induce pro-inflammatory cytokines production in vitro.^{28,29} In the present work, propolis treatment did not antagonize the stress negative effects against pro-inflammatory cytokines. A previous work of our laboratory showed that the same cytokines were inhibited in C57Bl/6 mice submitted to restraint stress for 14 consecutive days, and propolis administration did not antagonize their inhibition as well.¹⁰

The anti-inflammatory effect induced by glucocorticoids during stress has been reported by other authors. A decreased IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression was observed in the spleen, pituitary, hypothalamus, hippocampus and striatum of mice submitted to restraint stress, even after LPS injection.³⁰ Low IFN- γ , IL-6 and TNF- α production was observed in stressed mice infected with *Escherichia coli*, leading to a higher susceptibility to infection.³¹ Stressed mice treated with glucocorticoid receptor antagonists had the cytokine production, the recruitment of inflammatory cells and wound healing similar to unstressed control.³²

TLRs have been widely investigated recently due to their role to recognize exogenous pathogens, responding to microbial ligands and activating several aspects of innate and adaptive immune responses via cytokines, chemokines, and cell surface molecules, enhancing phagocytosis and the capacity to present antigens to T cells.³³

These receptors are expressed by different immune cells including monocytes, macrophages, neutrophils, mast cells, T and B lymphocytes, and dendritic cells.³⁴

One of the best TLRs characterized is TLR-4. This receptor recognizes Gram-negative bacteria LPS in a complex way involving the presence of CD14 receptor and the MD-2 protein that is associated with TLR-4 exodomain.³⁵ TLR-4 has been widely studied because of its importance in the immune response against bacterial infection and to be involved in infected cells apoptosis.³⁶ Since glucocorticoids may regulate TLRs expression,³⁷ and TLR pathways can be downregulated by glucocorticoids through the inhibition of NF- κ B and AP-1 transcriptional activities^{38,39}, we aimed to observe whether propolis treatment could induce TLR-4 expression in spleen cells from stressed mice, since it has been related that TLR expression can be influenced by natural products.⁴⁰ Furthermore, a recent work of our laboratory showed that propolis induced a higher TLR-4 expression in non-stressed mice (unpublished data).

Data showed a decreased TLR-4 gene expression in spleen cells from stressed mice. However, propolis treatment counteracted the inhibition of TLR-4 expression induced by stress, and the suppressive action of corticosterone might have limited at least in part the immunostimulatory activity of propolis on TLR-4 expression. Our results are in accordance to other authors who reported that TLR-2 and TLR-4 expression was suppressed in peripheral blood mononuclear cells from patients after surgical stress, due to the modulation of these receptors expression by steroids.⁴¹ TLRs expression was also inhibited in intestinal epithelial cells from *Toxoplasma gondii*-infected mice submitted to cold stress.⁴² However, it has been also reported that glucocorticoids can induce TLR-2 and TLR-4 expression in multiple cell types,⁴³ suggesting that the role of glucocorticoids on TLRs modulation is not completely clear.

TLRs activation may be associated with pro-inflammatory cytokines production.²⁵ Although an inhibition in pro-inflammatory cytokines production by stressed mice was seen even after propolis treatment, TLR-4 gene expression was restored after propolis administration. It has been reported that glucocorticoids led to an augmentation of TLRs expression by dendritic cells, while pro-inflammatory cytokines (IL-12 and TNF- α) were inhibited even in response to TLR agonists, suggesting that cytokines could be blocked downstream whereas the expression of the receptor was not affected by this blockage.⁴⁴ These data suggested that TLR expression is not always followed by higher cytokines production due to inhibitory events on cytokine genes transcription, pointing out that the regulatory mechanisms of glucocorticoids on immune cells still need to be elucidated.

Based on these findings, one may conclude that propolis exerted a restorative effect on TLR-4 expression by spleen cells, contributing to a better recognition of microorganisms during stress, although it did not antagonize the stress-induced inhibition on pro-inflammatory cytokines production. These data are new and important since propolis effect on cell receptors expression was never mentioned before. Further studies are required to a better comprehension of the exact mechanisms of action of this natural product on immune system against stress-induced negative effects.

METHODS

Animals and stress procedures

Eight to twelve weeks-old BALB/c male mice were kept in the Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, Campus of Botucatu, at 22-24°C and 12h / 12h light-dark cycle, with food and water *ad libitum* for a week before the assays. Animal procedures were carried out in accordance with Ethical

Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA – 25/05/07).

Mice were stressed by restraint in an immobilization conical tube of 50 mL (restrainer) with ventilation holes for 3 consecutive days, increasing the immobilization period (30min, 1h and 2h, respectively). All stress procedures occurred at 8:00 a.m. and control group had no access to water and food during stress sessions.⁴⁵

Propolis extract

Propolis was produced by *Apis mellifera* L. in the apiary located in the Lageado Farm, UNESP, Campus of Botucatu, using plastic nets. Samples were subsequently frozen to promote propolis removal from the nets. Afterwards, propolis was ground and a 30% ethanol extract was prepared (30g of propolis added to a 70% ethanol solution totaling 100 mL), in the absence of bright light, at room temperature and shaken moderately⁹. After a week, extracts were filtered and final concentrations were calculated, obtaining the dry weight of the solutions (120mg/mL). Specific dilution was carried out to determine the concentration of propolis solution to be given to the animals (200 mg/kg).

Experimental groups

Mice were randomly divided into 3 groups (G1, G2 and G3), with 8 animals each. G1 was considered control, and G2 was submitted to restraint stress as described in 2.1. Both G1 and G2 received physiological solution (NaCl 0.9%, 0.1 mL) by gavage before stress sessions. G3 was treated with propolis (200 mg/kg/day, 0.1 mL) by gavage and immediately submitted to stress protocols. All groups were sacrificed using a CO₂ inhalation chamber, in the third day, immediately after stress procedure.

Corticosterone determination

After sacrifice, blood of all experimental groups was obtained by cardiac puncture and sera were used for corticosterone determination by radioimmunoassay, using commercial kits and following the manufacturer's instructions (Coat-A-count®Rat Corticosterone, Siemens, Los Angeles, CA).

Spleen cells cultures and cytokines determination

Spleens were immediately removed after mice sacrifice and cells were suspended at a concentration of $5 \times 10^6/\text{mL}$ in RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% L-glutamine and cultured in flat-bottomed 24-well plates. Cells were cultured in triplicates (1 mL/well) and stimulated with LPS ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24h and 5% CO_2 .

Supernatants of spleen cell cultures were collected and assayed for pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) determination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Diego, USA). Briefly, a 96-well flat bottom Maxisorp (Nunc, USA) was coated with capture antibody specific to each cytokine. The plate was washed and blocked before 100 μL of the supernatants and serially diluted specific standards were added to the respective wells. Following a series of washing, the captured cytokine was detected using the specific conjugated detection antibody. The chromogen/substrate reagent was added into each well and, after color development, the plate was read at 450 nm, using an ELISA plate reader.⁴⁶

RNA isolation and cDNA synthesis

Thirty mg of the spleens was kept in 250µl of RNA Safer (Omega Bio-tek, Inc. USA) at -80 °C until RNA isolation procedures. Total RNA was extracted with RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE – Healthcare, USA) following the manufacturer's instructions. After purification, RNA was treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) for 30 min at 37°C to avoid false-positive results due to amplification of contaminating genomic DNA. Concentrations of total RNA were determined from the absorbance value of the samples at 230 nm. cDNA was synthesized from 1µg of total RNA and was reverse-transcribed with 2µl of random primer (250 ng/µL) in a final volume of 10 µL and mixture was incubated for 5 min at 70 °C. For each sample, the master mix was prepared with 8 µL of reaction buffer (Improm II 5x), 4.8 µL of MgCl₂ (25mM), 2 µL of RNase Out (Invitrogen), 1 µL of dNTP mix (20mM), 1 µL Improm RT II (Promega, USA) and 13.2 µL of nuclease-free water. To each sample, 16 µl of master mix were added and the mixture was incubated for 5 min at 25 °C, 60 min at 42 °C and for 15 min at 70 °C. Each cDNA sample was stored at -20°C.

Quantitative Real Time PCR

Primers were designed based on sequences retrieved from Genebank using the IDTSciTools (<http://www.idtdna.com>) software and synthesized by Applied Biosystems (USA). The sequences of specific primers were: 5'- TGACAGGAAACCCTATCC AGAGTT -3' (F) and 5'- TCTCCACAGCCACCAGATTCT-3' (R) for murine TLR-4 (GeneBank accession number: NM021297). Primers for β-actin found in literature⁴⁷ were used: 5'-AAGTGTGACGTTGACATCCGTAA-3'(F) and 5'- TGCCTGGGTACATGGTGGTA-3' (R). The PCR mixture consisted to 4 µl of cDNA,

0.4 μ L of each primer (200nM), 10 μ l of 2X Power Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 5.2 μ l of sterile nuclease-free water for a final volume of 20 μ l. The reaction conditions were as follows: 95 °C/10 min for initial denaturation, amplification for 40 cycles (95 °C for 15 s for denaturation, 60 °C for 1 min for annealing and extension), and to confirm the PCR product one cycle of melting curve analysis at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 95 °C for 15 s. Fluorescence data were collected during each annealing/extension step and threshold cycle numbers (C_T) were determined using ABI PRISM® 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems, USA) and software SDS version 1.2.3 (“Sequence Detection Systems” 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System - Applied Biosystems, USA). Reaction mixtures with no cDNA were used as negative control and all PCR assays were performed in duplicate.

The standard-curve was generated by performing serial dilutions of cDNA. To the smallest dilution of cDNA standard it was given the relative value 100 and, following the same reason of dilution, the other 3 points were 50, 25 and 12.5. Gene-specific expression values were normalized to expression values of β -actin (endogenous control) within each sample.

Statistical Analysis

Data were analyzed using the Graph Pad statistical software (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Significant differences between treatments were determined by ANOVA, followed by Tukey-Kramer’s test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (2007/02692-6) and CAPES (199-01/2007).

REFERENCES

- 1 Safieh-Garabedian B, Poole S, Haddad JJ, Massaad CA, Jabbur SJ, Saadé NE. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology* 2002; **42**: 864-872.
- 2 Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. *Int Immunopharmacol* 2002; **2**: 315-324.
- 3 Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, *et al.*. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med* 2005; **201**: 1113-1123.
- 4 Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress system– organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* 2006; **13**: 257-67.
- 5 Vegas O, Fano E, Brain PF, Alonso A, Azpiroz A. Social stress, coping strategies and tumor development in male mice: behavioral, neuroendocrine and immunological implications. *Psychoneuroendocrinology* 2006; **31**: 69–79.
- 6 Nieman DC. Exercise immunology: future directions for research related to athletes, nutrition and the elderly. *Int J Sports Med* 2000; **21**: 61–68.
- 7 Rasheed N, Tyagi E, Ahmad A, Siripurapu KB, Lahiri S, Shukla R, *et al.*. Involvement of monoamines and proinflammatory cytokines in mediating the anti-stress effects of *Panax quinquefolium*. *J Ethnopharmacol* 2008; **117**: 257-262.

- 8 Missima F, Sforcin JM. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs in chronically stressed mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; **5**: 71-75.
- 9 Sforcin JM, Missima F, Orsatti CL, Pagliarone AC, Kaneno R. Propolis effect on Th1/Th2 cytokine profile in melanoma-bearing mice submitted to stress. *Scand J Immunol* 2008; **68**: 216-217.
- 10 Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Sforcin JM. Propolis effect on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. *J ApiProd ApiMed Sci* 2009; **1**: 11-15.
- 11 Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; **2**: 29-32.
- 12 Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, *et. al.* Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z Naturforsch* 1999; **54c**: 401-405.
- 13 Boudourova-Krasteva G, Bankova V, Sforcin JM, Nikolova N, Popov S. Phenolics from Brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1997; **52c**: 676–679.
- 14 Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 1998; **29**: 361–367.
- 15 Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 2005; **100**: 276-83.
- 16 Sforcin JM, Fernandes Jr. A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; **73**: 2443-2249.

- 17 Silici S, Koç NA, Ayangil D, Çankaya S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *J Pharmacol* 2005; **99**: 33-44.
- 18 Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, *et al.* Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett.* 2007; **252**: 235-43.
- 19 Bufalo MC, Figueiredo AS, De Sousa JPB, Candeias JMG, Bastos JK, Sforcin JM. Antiviral activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis and poliovirus quantification by real-time PCR. *J Appl Microbiol*, submitted.
- 20 Simões LM, Gregorio LE, Da Silva Filho AA, De Souza ML, Azzolini AE, Bastos JK, *et al.* Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol* 2004; **94**: 59-65.
- 21 Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007;**113**:1-14.
- 22 Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 9577-82.
- 23 Medzhitov R. Review. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;**1**: 135-145.
- 24 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 499-511.
- 25 Doyle SL, O'Neill LAJ. Toll-like receptors: from the discovery of NF- κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 2006; **72**: 1102-1113.

- 26 Kemeny ME, Schedlowski M. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression. *Brain Behav Immun* 2007; **21**: 1009-1018.
- 27 Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melen K, Matikainen S. Molecular pathogenesis of influenza A virus and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**: 171-80.
- 28 Dimov V, Ivanovska N, Manolova N, Bankova V, Nikolov N, Popov S. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie* 1991; **22**: 155-62.
- 29 Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, *et al.* Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim. Toxins* 2000; **6**: 205-19.
- 30 Goujon E, Parnet P, Layé S, Combe C, Kelley KW, Dantzer R. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary and brain of mice. *Brain Behav Immun* 1995; **9**: 292-303.
- 31 Kiank C, Holtfreter B, Starke A, Mundt A, Wilke C, Schiit C. Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun* 2006; **20**: 359-68.
- 32 Mercado AM, Padgett DA, Sheridan JF, Marucha PT. Altered kinetics of IL-1 α , IL-1 β and KGF-1 gene expression in early wounds of restrained mice. *Brain Behav Immun* 2002; **16**: 150-62.
- 33 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; **17**: 1-14.

- 34 Suttmuller RPM, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 2006; **27**: 387-93.
- 35 Visitin A, Iliev DB, Monks BG, Halmen KA, Golenbock DT. MD-2. *Immunobiology* 2006; **211**: 437-47.
- 36 Haase R, Kirschning CJ, Sing A, Schrottner P, Fukase K, Kusumoto S, *et al.* A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol* 2003; **171**: 4294-4303.
- 37 Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, *et al.* Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB Journal* 2002; **16**: 61-71.
- 38 Riccardi C, Bruscoli S, Migliorati G. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharm Res* 2002; **45**: 361-8.
- 39 Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signaling. *Eur Respir J* 2006; **27**: 413-426.
- 40 Pannacci M, Lucini V, Colleoni F, Martucci C, Grosso S, Sacerdote P, *et al.* *Panax ginseng* C.A. Mayer G 115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage toll-like receptor 4 expression during physical stress. *Brain Behav Immun* 2006; **20**: 546-51.
- 41 Ikushima H, Nishida T, Takeda K, Ito T, Yasuda T, Yano M, *et al.* Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is downregulated after operation. *Surgery* 2004; **135**: 376-85.
- 42 Gopal R, Birdsell D, Monroy FP. Regulation of toll-like receptors in intestinal epithelial cells by stress and *Toxoplasma gondii* infection. *Parasite Immunol* 2008; **30**: 563-576.

- 43 Homma T, Kato A, Hashimoto N, Batchelor J, Yoshikawa M, Imai S, *et al.* Corticosteroid and cytokines synergistically enhance Toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol* 2004; **31**: 463–469.
- 44 Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006; **120**: 260–271.
- 45 Sforcin JM, Nunes GA, Missima F, Sá-Nunes A, Faccioli LH. Effect of a leukotriene inhibitor (MK886) on nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages of acutely and chronically stressed mice. *J Pharm Pharmacol.* 2007; **59**: 1249-1254.
- 46 Tan EL, Selvaratnam G, Kananathan R, Sam CK. Quantification of Epstein-Barr virus DNA load, interleukin-6, interleukin-10, transforming growth factor- β 1 and stem cell factor in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 2006; **6**: 227.
- 47 Yang H, Xu Z, Iuvone PM, Grossniklaus HE. Angiostatin decreases cell migration and vascular endothelium growth factor (VEGF) to pigment epithelium derived factor (PEDF) RNA ratio in vitro and in a murine ocular melanoma model. *Mol Vis* 2006; **12**: 511-517.

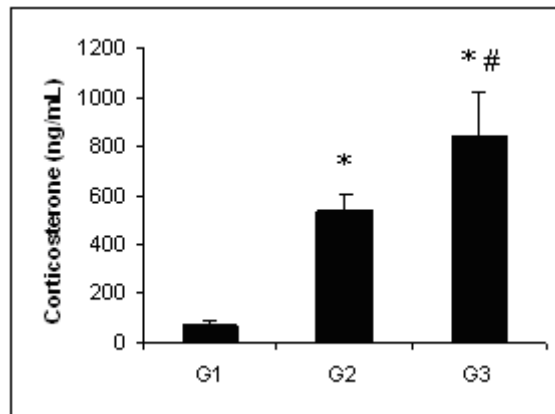


Fig. 1. Serum corticosterone concentration (ng/mL). G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as means and standard-deviation (n = 8). * significantly different from control ($P<0.001$); # significantly different from stress ($P<0.001$).

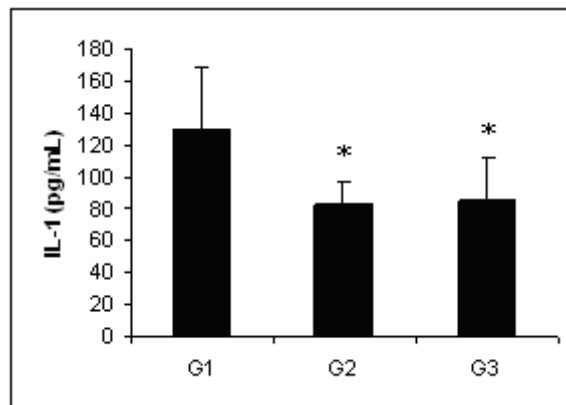


Fig. 2. IL-1 β production (pg/mL) by spleen cells stimulated with LPS (5 μ g/mL) for 24 h. G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as means and standard-deviation (n = 8). * significantly different from control ($P<0.01$).

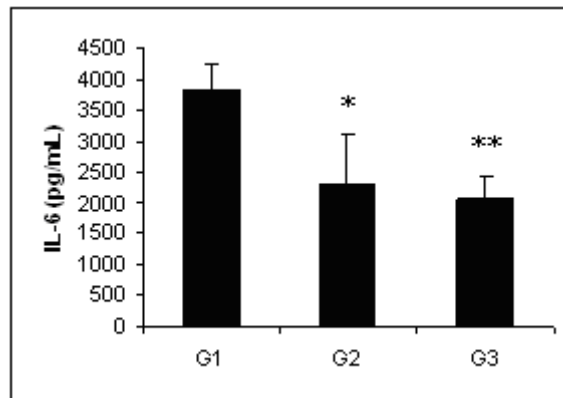


Fig. 3. IL-6 production (pg/mL) by spleen cells stimulated with LPS (5 µg/mL) for 24 h. G1 = control, G2 = stress, and G3 = propolis + stress. Data are expressed as means and standard-deviation (n = 8). * significantly different from control ($P<0.01$); . ** significantly different from control ($P<0.001$).

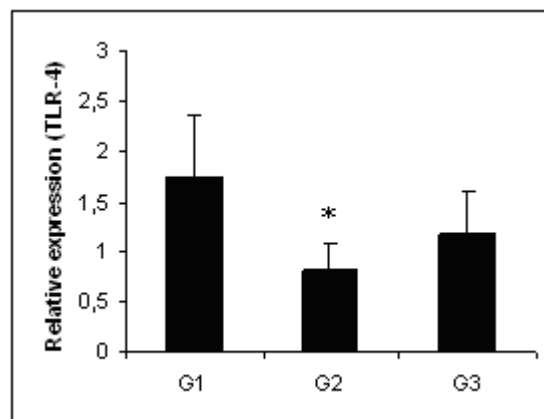


Fig. 4. Relative expression of mRNA TLR-4 by spleen cells. G1 = control; G2 = stress, G3 = propolis + stress. All results were normalized to β -actin. Data are expressed as mean and standard-deviation (n=8). * significantly different from control ($p<0.05$).

Conclusão

A maior produção de corticosterona pelos animais estressados inibiu a produção das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) pelas células esplênicas, e o tratamento destes animais com própolis não reverteu este efeito, o que indica que, possivelmente, os glicocorticóides interferiram na ação imunorestauradora da própolis.

Um outro mecanismo de supressão mediado pelos glicocorticóides foi a inibição da produção de IFN- γ (citocina Th1) e de IL-4 (citocina Th2), demonstrando que o estresse pode influenciar negativamente tanto as respostas imunes celular e humoral. O tratamento com a própolis, no entanto, não antagonizou a inibição de IFN- γ . Deste modo, podemos concluir que o tratamento com própolis pode levar à indução da resposta humoral, inibindo a resposta celular (via aumento de IL-4 e inibição de IFN- γ). Assim, este produto natural exerceu atividade imunorestauradora sobre a resposta imune humoral, o que seria interessante no caso de infecções por microrganismos extracelulares e doenças inflamatórias crônicas, as quais podem ser favorecidas em situações de estresse.

Por fim, também foi verificado que animais estressados apresentaram inibição da expressão de TLR-4, mas a própolis impediu a ação inibitória da corticosterona.

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem a possível utilização da própolis em momentos de estresse, em virtude de sua ação imunomoduladora sobre os parâmetros avaliados. Contudo, novos experimentos poderão ser realizados para verificar, por exemplo, a eficácia da própolis em animais submetidos a estresse e concomitantemente a infecções.

Referências*

- Abraham SM, Clark AR. Dual-specificity phosphatase. 1. A critical regulator of innate immune responses. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1018–23.
- Aguilera G. Corticotrophin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9: 329-36.
- Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artemillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett.* 2007; 252: 235-43.
- Akira S, Takeda K. *Toll-like* receptor signaling, *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499–511.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NFkappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732–8.
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor 2. *EMBO J* 2000;19:3325-36.
- Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Z. Naturforsch.* 2003; 58c: 580-89.
- Antoni MH, Schneiderman N, Penedo F. Behavioral interventions: immunologic mediators and diseases outcomes. In: ADER, R. (Ed.), *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, San Diego 2007; 675-703.
- Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349:1526–33.
- Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 2002; 3: 30111-6.
- Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Sheridan JF. Social stress alters splenocyte phenotype and function. *J Neuroimmunol* 2002; 132:66–71.

* Referências bibliográficas elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references [homepage on internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: [http:// www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

- Bailey MT, Engler H, Powell, ND, Padgett DA, Sheridan JF. Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor- dependent pathway. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 2007; 293: 1180-90.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissues sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 1996; 17: 245–61.
- Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Funari SRC, Popov S, Sforcin JM. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 1998; 29: 361-67.
- Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z. Naturforsch* 1999; 54c:401-405.
- Bankova VS, De Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in research on chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
- Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:29-32.
- Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki J, Kadota S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J Nat Prod* 1998; 61: 896–900.
- Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14: 436–41.
- Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 245-54.
- Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 28-49.
- Batuman OA, Ferrero A, Cupp C, Jimenez SA, Khalili K. Differential regulation of transforming growth factor β -1 gene expression by glucocorticoids in human T and glial cells. *J Immunol* 1995;155: 4397–5.
- Baus E, Andris F, Dubois PM, Urbain J, Leo O. Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. *J Immunol* 1996; 156: 4555-61.

- Bellochio S, Montagnolt C, Bozza S, Gaziano R, Rossi, G, Mambula SS, et al. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* 2004; 172: 3059-69.
- Bentley AM, Hamid Q, Robinson DS, Schotman E, Meng Q, Assoufi B, et al. Prednisolone treatment in asthma: reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon- γ cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 551–56.
- Bhatnagar S, Dallman M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 1998; 84: 1025-39.
- Bhatnagar S, Vining C. Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm Behav* 2003; 43: 158-65.
- Bielajew C, Konkle ATM, Merali Z. The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: 1. Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res* 2002; 136: 583-92.
- Bischof F, Melms A. Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+lymphocytes. *Cell Immunol* 1998; 187: 38-44.
- Blotta MH, Dekruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 1997;158: 5589-95.
- Bluthé RM, Walter V, Parnet P, Laye S, Lestage J, Verrier D, et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III* 1994; 317: 499-503.
- Bonneau RH, Sheridan JF, Feng N, Glaser R. Stress-induced suppression of HSV-specific cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell activity and enhancement of acute pathogenesis following local HSV infection. *Brain, Behav Immun* 1992; 5: 170– 92.
- Borelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002; 73: 53-63.

- Bornstein SR, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Zacharowski K. Toll like receptor 2 and toll like receptor 4 expression in human adrenals. *Horm Metab Res* 2004; 36: 470–73.
- Boudourova-Krasteva G, Bankova V, Sforcin JM, Nikolova N, Popov S. Phenolics from Brazilian propolis. *Z Naturforsch* 1997; 52c: 676–79.
- Bradding P, Feather IH, Wilson S, Holgate ST, Howarth PH. Cytokine immunoreactivity in seasonal rhinitis: regulation by a topical corticosteroid. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1900–6.
- Broug-Holub E, Kraal G. Dose- and time-dependent activation of rat alveolar macrophages by glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 1996; 104: 332–36.
- Broug-Holub E, Persoons JH, Schornagel K, Mastbergen SC, Kraal G. Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1998; 19: 842–48.
- Bufalo MC, Figueiredo AS, De Sousa JPB, Candeias JMG, Bastos JK, Sforcin JM. Antiviral activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis and poliovirus quantification by real-time PCR. *J Appl Microbiol*, submitted.
- Burdock, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 347–63.
- Buske-Kirschbaum A, Geiben A, Hollig H, Morschhauser E, Hellhammer D. Altered responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002; 87: 4245–51.
- Buwalda B, De Boer SF, Schmidt ED, Feiszeghy K, Nyakas C, Sgoifo A, et al. Long-lasting deficient dexamethazone suppression of hypothalamic–pituitary–adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 513–20.
- Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 2000; 6: 164–70.
- Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van De Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 401–12.

- Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002; 73: 1-6.
- Castro SL. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee- product. *Annu Rev Biomed Sci* 2001; 3: 49-83.
- Cato ACB, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* 1996; 18: 371–8.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 259–84.
- Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1639-79.
- Chenoskova V, Melmed S. Minireview: neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 2002; 143: 1571-4.
- Chinenov Y, Rogatzsky I. Glucocorticoids and the innate immune system: Crosstalk with the Toll-like receptor signaling network. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 30–42.
- Chover-Gonzalez AJ, Lightman SL, Harbuz MS. An investigation of the effects of interleukin-1 beta on plasma arginine vasopressin in the rat: role of adrenal steroids. *J Endocrinol* 1994;142: 361-66.
- Chrousos GP. The hypothalamus-pituitary-adrenal axis and immune mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332: 1351–62.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufelds G, Levi B. Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736-41.
- Cole MA, Kalman BA, Pace TWW, Topczewski F, Lowrey MJ, Spencer RL. Selective blockade of the mineralocorticoid receptor impairs hypothalamic– pituitary– adrenal axis expression of habituation. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 1034– 42.
- Coqueret O, Dugas B, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Regulation of IgE production from human mononuclear cells by β 2-adrenoceptor agonists. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 304-11.
- Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+ CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2005; 175: 8051-59.

- Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial- leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9991-5.
- Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc* 2004; 15: 964-70.
- Dallman MF, Arkana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43: 113-73.
- Dantzer R. Cytokine, sickness behavior and depression. *Neurol Clin* 2006; 24: 441-60.
- Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P, Ray A. A critical role for NF- κ B in GATA 3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 2001; 500: 45-50.
- De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, Bellastella A. Prolactin and autoimmunity. *Pituitary* 2005; 8: 25-30.
- De Kloet ER Stress in the brain. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 187-98.
- De Vente W, Olff M, Van Amsterdam JGC, Kamphuis JH, Emmelkamp PMG. Physiological differences between burnout patients and healthy controls: blood pressure, heart rate, and cortisol responses. *Occup Environ Med* 2003; 60: 54-61.
- Dhabhar FS. Stress-induced augmentation of immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behav, Immun* 2002; 16: 785-98.
- 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* 2001; 2: 7.
- Doyle S, O'Neill LAJ. Toll-Like receptors: from the discovery of NF- κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 2006; 72:1102-13.
- Edwards KM, Burns VE, Reynolds T, Carroll D, Drayson M, Ring C. Acute stress exposure prior to influenza vaccination enhances antibody response in women. *Brain, Behav, Immun* 2006; 20: 159–68.

- Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 359-68.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 595-638.
- Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress system- organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13: 257-67.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 1994; 14: 897-913.
- Eriksen HR, Olff M, Murison R, Ursin H. The time dimension in stress responses: relevance for survival and health. *Psychiatry Res* 1999; 85: 39-50.
- Eskandari F, Webster JI, Sternberg EM. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:251-65.
- Fehérvári Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1769-80.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cells: IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989; 490: 2081-95.
- Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Dummer LA, Vargas GD, Hubner SO, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SUHV-1. *Vaccine*. 2007; 25: 1250-1256.
- Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimarães S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 2006;13: 170-5.
- Gadek-Michalska A, Bujaski J. Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 449-59.
- Gagro A, Tominac M, Krsulovic-Hresic V, Bace A, Matic M, Drazenovic V, et al. Increased Toll-like receptor 4 expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 267-72.
- Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979; 60: 59-84.
- Glaser R, Pearson GR, Jones JF, Hillhouse J, Kennedy S, Mao HY, et al. Stress-related activation of Epstein–Barr virus. *Brain, Behav Immun* 1991; 5: 219– 32.

- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-associated immune modulation: relevance to viral infections and chronic fatigue syndrome. *Am J Med* 1998; 105: 35–42.
- Gopal R, Birdsell D, Monroy FP. Regulation of toll-like receptors in intestinal epithelial cells by stress and *Toxoplasma gondii* infection. *Parasite Immunol* 2008; 30: 563-76.
- Guruvayoorappan C, Phil M, Kuttan G. β -Carotene inhibits tumor-specific angiogenesis. *Integr Cancer Ther* 2007; 6: 258-70.
- Haddad JJ, Saadé NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immuneendocrine interactions: a role for the hypothalamic–pituitary–adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol* 2002; 133: 1–19.
- Hansen PE, Floderus B, Frederiksen K, Johansen C. Personality traits, health behavior, and risk for cancer: a prospective study of Swedish twin court. *Cancer* 2005;103: 1082-91.
- Harbuz MS, Rees RG, Lightman SL. HPA axis responses to acute stress and adrenalectomy during adjuvant-induced arthritis in the rat. *Am J Physiol* 1993; 264:179-85.
- Havsteen B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96:167-202.
- Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and its associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003; 198: 1563-72.
- Head CC, Farrow MJ, Sheridan JF, Padgett DA. Androstenediol reduces the anti-inflammatory effects of restraint stress during wound healing. *Brain, Behav Immun* 2006; 20: 590-96.
- Heer AK, Shamshiev A, Donda A, Uematsu S, Akira S, Kopf M, et al. TLR signaling fine-tunes anti-influenza B cells responses without regulating effector T cell responses. *J Immunol* 2007; 178: 2182-91.
- Hegazi A G, Hady F K A E, Allah F A M A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch* 2000; 55c(1–2): 70–75.
- Hoffman GS. Immunosuppressive therapy for autoimmune diseases. *Allergy* 1993; 70: 263–74.
- Hollands I, Vidal A, Gra B, Sotolongo M. Evaluation of the sub-chronic toxicity of Cuban propolis. *Rev Cuba Cienc Vet* 1991; 22: 91-100.

- Hrytsenko VI, Tykhonov OI, Pryakhin OR. Study of the polysaccharide preparation propolis. *Farm Zh* 1977; 32 : 92-93.
- Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 276-83.
- Huleihel M, Isanu V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Isr. Med. Assoc. J.* 2002; 4: 923-27.
- Ikushima H, Nishida T, Takeda K, Ito T, Yasuda T, Yano M, et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is downregulated after operation. *Surgery* 2004; 135: 376-85.
- Imasato A, Desbois-Mouthon C, Han J, Kai H, Cato AC, Akira S, et al. Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable *Haemophilus influenzae* induced expression of Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 2002; 277: 47444–50.
- Inoue K, Saito M, Kanai T, Kawata T, Shigematsu N, Uno T, et al. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line *in vivo* and *in vitro*. *Am J Chin Med* 2008; 36: 624-34.
- Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naïve CD4 T cells in the lymphnode. *Nat Immunol* 2003; 4: 733-39.
- Jacobs R, Pawlak CR, Mikeska E, Meyer-Olson D, Martin M, Heijnen CJ, et al. Systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients differ from healthy controls in their cytokine pattern after stress exposure. *Rheumatology* 2001; 40: 868-75.
- Jafarian-Tehrani M, Sternberg EM. Animal models of neuroimmune interactions in inflammatory diseases. *J Neuroimmunol* 1999;100: 13–20.
- Jara LJ, Vera-Lastra O, Miranda JM, Alcalá M, Alvarez-Nemegyei J. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; 10: 748–56.
- Joosten LA, Koenders MI, Smeets RL, Heuvelmans-Jacobs M, Helsen MM, Takeda K, et al. Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 2003; 171: 6145-53.
- Kaneeda J, Nishina T. Safety of propolis. Acute toxicity. *Honeybee Science* 1994; 15: 29-33.

- Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 984-93.
- Kariagina A, Romanenko D, Ren S, Chenoskova V. Hypothalamic-pituitary cytokine network. *Endocrinology* 2004; 145:104-12.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11: 115–22.
- Kemeny ME, Schedlowsky M. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: A stepwise progression. *Brain, Behav Immunity* 2007; 21: 1009-18.
- Kim JD, Liu L, Guo W, Meydani M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J. Nutr. Biochem.* 2006; 17: 165-176.
- Kimbrell DA, Beutler B. The revolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 256-67.
- Kimoto T, Koya S, Hino K, Yamamoto Y, Nomura Y, Micallef MG, et al. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and asrtepillin C. *Pathol. Int* 2000; 50: 679-89.
- 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. *Progr NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 823-30.
- Kobe B, Kajara AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 725-32.
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 2002; 25: 154-9.
- Krieg A M, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546–49.
- Kubera M, Kenis G, Bosmans E, Zieba A, Dudek D, Nowak G, et al. Plasma levels of interleukin-6, interleukin-10, and interleukin-1 receptor antagonist in depression: comparison between the acute state and after remission. *Pol J Pharmacol* 2000; 52: 237– 41.

- Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 2003; 51: 740-42.
- Kumazawa S, Yoneda M, Nakayama T. Constituents in Brazilian propolis and its plant of origin. *FFI J* 2004; 209: 132–139.
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 235–40.
- Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogenactivated protein kinase p38. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 771–80.
- Lee HK, Duzendorfer S, Soudal K, Tobias PS. Double-stranded RNA- mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* 2006; 24: 153-63.
- Le Tulzo Y, Shenkar R, Kaneko D, Moine P, Fantuzzi G, Dinarello CA, et al. Hemorrhage increases cytokine expression in lung mononuclear cells in mice: involvement of catecholamines in nuclear factor- κ B regulation and cytokine expression. *J Clin Invest* 1997; 99: 1516–24.
- Lemaitre B, Nicholas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffman JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-83.
- Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3-22.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, et al. Toll-like receptor 4 impairs ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; 105: 497-504.
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature* 2005; 5: 447-52.
- Lima ROA, Bazo AP, Said RA, Sforcin JM, Bankova V, Darros BR, et al. Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environ. Mol. Mutagen* 2005; 45: 8–16.
- Lima ROA. Mecanismos de ação da própolis na modulação de danos quimicamente induzidos no DNA. Doctoral Thesis. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil, 2007; 67 p.

- Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FI. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7048-53.
- Loria RM, Padgett DA. Androstenediol regulates systemic resistance against lethal infections in mice. *Arch Virol* 1992; 127: 103–15.
- Lye E, Mirtsos C, Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 40653–8.
- MacLeod H, Wetzler LM. T cell activation by TLRs: A role for TLRs in the Adaptive immune response. *Sci STKE* 2007; 4: pe48.
- Maes M, Lin A, Delmeire L, Van Gastel A, Kenis G, De Jongh R, et al. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 833-9.
- Malarkey WB, Zvara BJ. Interleukin-1-beta and other cytokines stimulate ACTH release from cultured pituitary cells of patients with Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 196–9.
- Mani F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol* 2006; 105: 95-98.
- Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 2006; 7:148–55.
- Marcucci MC. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; 26: 83-99.
- Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Vigueira C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2001; 74: 105-12.
- Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 2007; 90: 29-35.
- Marketon JI, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol* 2008; 252: 16-26.

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–397.
- Medzhitov R. Review: *Toll-like receptors* and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.
- Meerlo P, Overkamp GJF, Koolhaas JM. Behavioural and physiological consequences of a single social defeat in roman high- and low-avoidance rats. *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22: 155-68.
- Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004; 5: 503–7.
- Midorikawa K, Banskota AH, Tezuka Y, Nagaoka T, Matsushige K, Message D, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochem. Anal.* 2001; 12: 366-373.
- Millán S, González-Quijano MI, Giordano M, Soto L, Martín AI, López-Calderón A. Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. *Life Sci* 1996; 59: 1431-42.
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001; 292: 1907-10.
- Missima F, Sforcin JM. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs in chronically stressed mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 5: 71-5.
- Moynagh PN. Toll-like receptor signalling pathways as key target for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids. *J Endocrinol* 2003; 179: 139-44.
- Munari CC, Resende FA, Alves JM, De Sousa JP, Bastos JK, Tavares DC. Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in Chinese hamster ovary cell. *Planta Med* 2008; 74: 1363-7.
- Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC, Bankova V, Sforcin JM. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 331-34.
- Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem* 2003; 80: 29-33.

- Najafi MF, Vahedy F, Seyyedini M, Jomehzadeh HR, Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology* 2007; 54: 49-56.
- Nakaya N, Hansen PE, Schapiro IR, Eplov LF, Saito-Nakaya K, Uchitomi Y, et al. Personality traits and cancer survival: a Danish cohort study. *Br J Cancer* 2006; 95: 146-52.
- Natarajan K, Singh S, Burke Jr TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of nuclear transcription factor NF-KB. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 9090-95.
- Nicholas JG, Monique G, Alexander NRW. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev* 2006; 6: 693–8.
- Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Grande R, Cannatelli MA et al. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 2005; 19: 198–202.
- O’Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, Rodrick MI. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 1995; 222: 482-90.
- Olivier B, Zethof T, Pattij T, Van Boogaert M, Van Oorschot R, Leahy C, et al. Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 117-32.
- Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 2000; 6: 205-19.
- Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 359-68.
- Orsolic N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol. Pharm. Bull* 2005a; 28: 1928-33.
- Orsolic N, Terzic S, Sver L, Basic I. Polyphenolic compounds from propolis modulate innate responses and increase host resistance to tumor cells. *Food Agric. Immunol.* 2005b; 16: 165-79.

- Orsolic N, Basic I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 102: 37-45.
- Ostrander MM, Ulrich-Lay YM, Choi DC, Richtand NM, Herman JP. Hypoactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology* 2006; 147: 2008-17.
- Ottaviani E, Franceschi C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog Neurobiol* 1996; 48: 421-40.
- Palermo-Neto J, Massoco CMO, De Sousa WR. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain, Behav Immun* 2003;17: 43-54.
- Pannacci M, Lucini V, Colleoni F, Martucci C, Grosso S, Sacerdote P, et al. *Panax ginseng* C.A. Mayer G 115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage toll-like receptor 4 expression during physical stress. *Brain Behav Immun* 2006; 20: 546-51.
- Papadimitraki ED, Bertsias GK, Boumpas DT. Toll-like receptors and autoimmunity: A critical appraisal. *J Autoimmun* 2007; 29 : 310-18.
- Pariante CM, Pearce BD, Pisell TL, Sanchez CI, Po C, Su C, et al. The proinflammatory cytokine, interleukin-1 α , reduces glucocorticoid receptor translocation and function. *Endocrinology* 1999; 140: 4359-66.
- Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 2502–6.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299: 1033-36.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 2004; 6: 1382-87.
- Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005 438: 364–68.
- Paulino N, Abreu SR, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H, et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 587: 296-301.
- Pereira AD, De Andrade SF, Swerts MSO, Maistro EL. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2008; 46:2580-84.

- Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O., et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 4355-59.
- Pietta PG, Gordana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 2002; 73: 7-20.
- Pontin K, Da Silva Filho AA, Santos FF, Andrade e Silva ML, Cunha WR, Nanayakkara NPD, et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* 2008; 103: 487-92.
- Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* 2005; 12: 221-8.
- Pruett SB. Stress and the immune system. *Pathophysiology* 2003; 9:133-153.
- Ramirez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4⁺ T cells *in vitro*. *J Immunol* 1996; 156: 2406–12 .
- Rasheed N, Tyagi E, Ahmad A, Siripurapu KB, Lahiri S, Shukla R, et al. Involvement of monoamines and proinflammatory cytokines in mediating the anti-stress effects of *Panax quinquefolium*. *J Ethnopharmacol* 2008; 117: 257-262.
- Ray D, Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 1997; 18: 206-28.
- Resende FA, Alves JM, Munari CC, Senedese JM, Sousa JPB, Bastos JK, et al. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutat Res* 2007; 643: 112–18.
- Riccardi C, Bruscoli S, Migliorati G. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol Res* 2002; 45: 361-8.
- Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005; 204: 27–42.
- Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9577-82.
- Rojas IG, Padgett DA, Sheridan JF, Marucha PT. Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing. *Brain, Behav Immun* 2002; 16: 74-84.

- Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006; 120: 260–71.
- Ruis MAW, Te Brake JHA, Buwalda B, De Boer SF, Meerlo P, Korte SM, et al. Housing familiar male wild type rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24: 285–300.
- Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 87: 93-7.
- Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, et al. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7713– 6.
- Safieh-Garabedian B, Poole S, Haddad JJ, Massaad CA, Jabbur SJ, Saadé NE. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology* 2002; 42: 864-72.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 35: 1336-41.
- Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2: 33-38.
- Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasproicz DJ, Fuchs BA, Street NE. Differential expression of the β 2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 1997; 158: 4200-10.
- Santos FA, Bastos EM, Maia AB, Uzeda M, Carvalho MA, Farias LM et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytother Res* 2003; 17: 285–89.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr Rev* 2000; 21: 55-89.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two

- distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003;171: 4304–10.
- Sawaya AC, Tomazela DM, Cunha IB, Bankova VS, Marcucci MC, Custodio AR, et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst* 2004; 271: 3050-63.
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin ASJ. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270: 283–86.
- Schmitz G, Orso E. CD 14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 513-21.
- Schorr E, Arnason B. Interactions between the sympathetic nervous system and the immune system. *Brain, Behav Immun* 1999;13: 271-78.
- Sedenese JM, Rodrigues AR, Furtado MA, Faustino VD, Berretta AA, Marchetti JM, et al. Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *eCAM* 2008; 9: 1-7.
- Segerstrom SC. Individual differences, immunity, and cancer: lessons from personality psychology. *Brain, Behav Immun* 2003; 17: 92-7.
- Selye H. The stress of life. McGraw-Hill Book Co.: New York, 1978
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; 2: 947-50.
- Sforcin JM, Fernandes Jr A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 243-49.
- Sforcin JM, Fernandes Jr A, Lopes CAM, Funari SRC, Bankova V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Venom Anim Toxins* 2001; 7: 139-144.
- Sforcin JM, Kaneno R, Funari SRC. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J Venom Anim Toxins* 2002a; 8: 19-29.
- Sforcin JM, Novelli ELB, Funari SRC. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. *J Venom Anim Toxins* 2002b; 8: 244-54.
- Sforcin JM, Nunes AG, Missima F, Sá-Nunes A, Faccioli LH. Effect of a leukotriene inhibitor (MK886) on nitric oxide and hydrogen peroxide production by

- macrophages of acutely and chronically stressed mice. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59:1249-54.
- Sharif R, Dawra RK, Wasiluk K, Phillips P, Dudeja V, Kurt-Jones E, et al. Impact of Toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice. *Gut* 2009; 6
- Shi Y, Devadas S, Greeneltch KM, Yin D, Allan MR, Zhou JN. Stressed to death: Implication to Lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology. *Brain, Behav Immunol* 2003; 17: 18-26.
- Shimizu K, Ashida H, Matsuura Y, Kanazawa K. Antioxidative bioavailability of artemisin C in Brazilian propolis. *Arch Biochem Biophys* 2004; 424: 181-88.
- Shimizy T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis *in vitro* and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemoter* 2008; 19: 7-13.
- Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 99: 69-73.
- Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of α -adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990; 145: 1430–34.
- Stefanski V, Ben-Eliyahu S. Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms. *Physiol Behav* 1996; 60: 277-82.
- Sternberg EM. Neuroendocrine factors in susceptibility to inflammatory disease: focus on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Horm Res* 1995; 43: 159–61.
- Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of autoimmune/regulatory disease. *J Endocrinol* 200;169: 429–35.
- Sutmuller RPM, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 2006; 27: 387-93.
- Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 1997; 17:6274–82.

- Sy LB, Wu YL, Chiang BL, Wang YH, Wu WM. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1053-60.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14
- Tan-No K, Nakajima T, Shoji T, Nakagawasai O, Nijima F, Ishikawa M, et al. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carragenin- induced mouse paw edema. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 96-9.
- Tatefuji T, Izumi N, Ohta T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 966-70.
- Tavares DC, Barcelos GRM, Silva LF, Tonin CCC, Bastos JK. Propolis induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicol in Vitro* 2006; 20: 1154–58.
- Teixeira EW, Negri G, Meira RMSA, Message D, Salatino A. Plant origin of green propolis : bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2: 85-92.
- Thyaga-Rajan S, Madden KS, Stevens SY, Felten DL. Effects of L deprenyl treatment on noradrenergic innervation and immune reactivity in lymphoid organs of young F344 rats. *J Neuroimmunol* 1999; 96: 57-65.
- Tischner D, Reichardt HM. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 275: 62-70.
- Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999; 79: 1-71.
- Turvey SE, Hawn TR. Short analytical review. Towards subtlety: understanding the role of *Toll-like receptors* signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol* 2006;120:1-9.
- Ulrich-Lay YM, Engeland WC. Hyperinnervation during adrenal regeneration influences the rate of functional recovery. *Neuroendocrinology* 2000; 71:107-23.
- Van Dijen HH, De Goeij DC, Sutanto W, Moss J, De Kloet ER, Tilders FJ. Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology* 1993; 58: 57-64.

- Van Ketel WG, Bruynzeel DP. Occupational dermatitis in an accordion repairer. *Contact dermatitis* 1992; 27: 186.
- Vazques-Torres A, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis: I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages *in vitro*. *J Exp Med* 2000;192: 227-36.
- Vedhara K, Co NK, Wilcock CK, Perks P, Hunk M, Anderson S, et al. Chronic stress in elderly careers of dementia patients and antibody response to influenza vaccination. *Lancet* 1999; 353: 627-31.
- Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 2000; 74: 457-71.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73: 117-23.
- Viveros-Paredes JM, Puebla-Pérez AM, Gutiérrez-Coronado O, Sandoval-Ramírez L, Villaseñor-García MM. Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 774-81.
- Wang X, Wu H, Miller AH. Interleukin 1 α (IL-1 α)-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 65-75.
- West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by Toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 409-37.
- Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol* 1998; 161: 2723-30.
- Wu W, Yamaura T, Murakami K, Murata J, Matsumoto K, Watanabe H, Saiki I. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. *Life Sci* 2000; 66: 1827-38.
- Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 315-24.
- Yang K, Puel A, Zhang S, Eidenschenk C, Ku CL, Casrouge A, et al. Human TLR-7-, -8-, and -9- mediated induction of IFN- α /beta and lambda is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity* 2005; 23: 465-78.

- Yang Y, Mercep M, Ware CF, Ashwell JD. Fas and activation induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J Exp Med* 1995; 181: 1673–82.
- Yin D, Zhang Y, Stuart C, Miao J, Zhang Y, Li C, et al. Chronic restraint stress modulates expression of genes in murine spleen. *J Neuroimmunol* 2006; 117: 11-17.
- Young EA, Akana S, Dallman MF. Decreased sensitivity to glucocorticoid fast feedback in chronically stressed rats. *Neuroendocrinology* 1990; 51: 536-42.
- Zhang D, Kishihara K, Wang B, Mizobe K, Kubo C, Nomoto K. Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and Th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of *Listeria monocytogenes*. *J Neuroimmunol* 1998; 92:139-51.
- Zhang Y, Zhang Y, Miao J, Hanley G, Stuart C, Sun X, et al. Chronic restraint stress promotes immune suppression through Toll-like receptor 4-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. *J Neuroimmunol* 2008; 204: 13-19.
- Zhou D, Kusnecova AW, Shurin MR, Depaoli M, Rabin BS. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin-6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 1993; 133: 2523– 30.