



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Alan de Aguiar Lopes

**Estudos dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da própolis
sobre as células RAW 264.7 e na resposta inflamatória pulmonar
aguda causada pela exposição à fumaça de cigarro em
camundongos**

Rio de Janeiro
2012

Alan de Aguiar Lopes

Estudos dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da própolis sobre as células RAW 264.7 e na resposta inflamatória pulmonar aguda causada pela exposição à fumaça de cigarro em camundongos

-Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto.

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L864 Lopes, Alan de Aguiar.
Estudos dos efeitos antioxidantes da Própolis sobre as células RAW 264.7 e na resposta inflamatória pulmonar aguda causada pela fumaça de cigarro em camundongos / Alan de Aguiar Lopes. – 2012.
128 f.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Própolis - Teses. 2. Poluição por fumaça de tabaco. 3. Estresse oxidativo - Teses. 4. Pulmões – Teses. 5. Doença pulmonar obstrutiva crônica – Teses. 6. Macrófagos - Teses. I. Pôrto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.86

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alan de Aguiar Lopes

Estudos dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da própolis sobre as células RAW 264.7 e na resposta inflamatória pulmonar aguda causada pela exposição à fumaça de cigarro em camundongos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de julho de 2012.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Prof.^a Dra. Bruna Romana-de-Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha família, amigos e colegas, pelos momentos de diversão vividos, pelo compromisso assumido, pela esperança restaurada e pelo amor e fé sobre mim recebidos.

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que participaram da minha trajetória como aluno e como pessoa.

Durante esse tempo de mestrado e de laboratório, aprendi com todos vocês como é ser um pesquisador, como funciona a Ciência, como trabalhar em equipe. Além disso, aprendi como é ser uma pessoa, como ser um ser humano, nas suas virtudes e falhas.

Durante esse tempo de mestrado, aprendi que para ser mestre é necessário muitas das vezes aprender com o aluno as suas limitações, e que, através disto, você percebe os seus próprios limites e que está aprendendo, junto com ele, a superá-los e a gerenciá-los. Isso é gratificante!

Agradeço novamente a todos aqueles que participaram da minha trajetória: o Universo, minha família, professores, amigos e colegas. Vejo que olhar sobre o ombro de gigantes é algo magnífico, mas também é algo que precisa de muita maturidade e responsabilidade. Vejo que estou pronto para novos desafios em novos horizontes. Muito obrigado!

When you're sure you've had enough of this life, well hang on
Don't let yourself go
Everybody cries and everybody hurts sometimes

Sometimes everything is wrong
Now it's time to sing along

Everybody hurts – *R.E.M.*

RESUMO

LOPES, Alan de Aguiar. *Estudos dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da própolis sobre as células RAW 264.7 e na resposta inflamatória pulmonar aguda causada pela exposição à fumaça de cigarro em camundongos*. 2012. 128f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) causa a redução da capacidade respiratória e seu desenvolvimento é associado à fumaça de cigarro. O cigarro possui mais de 4800 substâncias tóxicas e causa a morte de seis milhões de pessoas por ano no mundo. Estudos buscam meios de reverter os males causados pela fumaça de cigarro. A própolis (P) é um produto produzido por abelhas que possui várias propriedades. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antioxidantes da P em macrófagos murinos e na inflamação pulmonar aguda induzida pela fumaça de cigarro (CS) em camundongos. A análise dos compostos fitoquímicos do extrato alcóolico da P (EAP) foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Células da linhagem RAW 264.7 foram tratadas em diversas concentrações de P durante 24 horas. Após tratamento, as seguintes análises foram realizadas: polifenóis totais; viabilidade celular (MTT); potencial redutor (DPPH); espécies reativas de oxigênio totais (ROS) e de malondialdeído (MDA). Trinta camundongos C57BL/6 foram divididos em 3 grupos (n=10/grupo): Controle+P, CS e CS+P. Ambos os grupos CS foram expostos a 6 cigarros/dia durante 5 dias. O grupo CS foi tratado com veículo. O pulmão e o lavado broncoalveolar (BAL) foram coletados para análise histológica e contagem diferencial de células. As análises para mieloperoxidase (MPO), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), MDA, nitrito e *western blotting* para TNF-alfa foram realizadas. A análise fitoquímica do EAP mostrou a presença dos ácidos hidrocínâmicos e coumárico, a artepilina C e a drupanina. Foi observado o aumento concentração-dependente dos níveis de polifenóis totais ($p < 0,001$), do MTT ($p < 0,001$) e do DPPH ($p < 0,001$), e o inverso com o MDA ($p < 0,001$). Os níveis de ROS diminuem nas concentrações de 15,6 e 31,2 mg/mL ($p < 0,05$, ambos). A histologia pulmonar do grupo Controle+P foi similar ao do CS+P e foi observado um influxo de macrófagos e neutrófilos no grupo CS ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Os níveis de MPO foram aumentados no grupo CS ($526,5 \pm 34,72$ mU/mg ptn, $p < 0,01$), mas houve uma redução no grupo CS+P ($385,1 \pm 27,64$ mU/mg ptn, $p < 0,05$) comparável ao Controle+P ($134 \pm 12,99$ mU/mg ptn, $p < 0,001$), o mesmo aconteceu com as enzimas antioxidantes: SOD (Controle+P: $523,5 \pm 29,6$ U/mg ptn; CS: $523,5 \pm 29,6$ U/mg ptn, $p < 0,001$; CS+P: $246,8 \pm 15,69$ U/mg ptn, $p < 0,001$); CAT (Controle+P: $37,38 \pm 3,39$ U/mg ptn; CS: $92,68 \pm 6,24$ U/mg ptn, $p < 0,001$; CS+P: $59,84 \pm 4,55$ U/mg ptn, $p < 0,05$); GPx (Controle+P: $2,23 \pm 0,17$ ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg ptn}$) $\times 10^{-1}$; CS: $4,51 \pm 0,31$ ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg ptn}$) $\times 10^{-1}$, $p < 0,001$; CS+P: $2,64 \pm 0,19$ ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg ptn}$) $\times 10^{-1}$, $p < 0,05$). O inverso ocorreu com a relação GSH/GSSG (Controle+P: $1,088 \pm 0,17$; CS: $0,736 \pm 0,07$, $p < 0,05$; CS+P: $1,258 \pm 0,10$, $p < 0,05$). Os níveis de MDA (Controle+P: $0,266 \pm 0,05$ nMol/mg ptn; CS: $0,94 \pm 0,076$ nMol/mg ptn, $p < 0,001$; CS+P: $0,498 \pm 0,06$ nMol/mg ptn, $p < 0,01$) e de nitrito (Controle+P: $50,01 \pm 4,19$ $\mu\text{Mol}/\text{mg ptn}$;

CS: $108,7 \pm 7,73$ $\mu\text{Mol/mg ptn}$, $p < 0,001$; CS+P: $58,84 \pm 3,42$ nMol/mg ptn , $p < 0,01$) estavam aumentados no CS que em outros grupos. A expressão de TNF- α foi observada no grupo CS. O tratamento da P apresentou ação anti-inflamatória e antioxidante em macrófagos e em camundongos expostos à fumaça de cigarro, possivelmente pela ação dos polifenóis presentes nela.

Palavras-chave: Própolis. Macrófagos murinos. Pulmão. Fumaça de cigarro. Antioxidante. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (DPOC) causes a respiratory capacity reduction and its development is be associated with cigarette smoke. Cigarette has more than 4800 toxic substances in your composition and it causes death of six million people in the world. Studies had been made to find methods to change cigarette-induced health problems. Propolis (P) has been reported as a natural product with several properties. Here, we used two types of experiments, *in vitro* and *in vivo*, to study the potential antioxidant use of P. Phytochemical analyze was made to evaluate which compounds are within P. Murine macrophages, RAW 264.7 cell line, are exposed to different concentrations of propolis and following analyses were made: total polyphenols levels; cell viability (MTT); reduction potential (DPPH); total reactive oxygen species levels (ROS) and malondialdehyde (MDA). Thirty C57BL6 mice were divided into 3 groups: Control+P, CS and CS+P. Both CS groups were exposed to 6 cigarettes per day for 5 days. CS group was treated with vehicle. Lung and bronchoalveolar lavage (BAL) were collected for histological analysis and differential cell counts. Analysis for mieloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), MDA, nitrite and western blotting for TNF-alpha were performed. Phytochemical analyses of P showed which possesses four main compounds: hydrocinnamic and coumaric acids; artemillin C and drupanin. P showed an increase in total polyphenols ($p < 0.001$), cell viability ($p < 0.001$) and DPPH levels ($p < 0.001$) in concentration-dependent manner, different from MDA ($p < 0.001$) which was inverse pattern. P decreased ROS levels in 15.6 and 31.2 mg/mL groups ($p < 0.05$). Lung histology of Control+P group was similar to CS and CS+P groups, however significant inflammatory cell influx was observed in CS group. Propolis administration reduced significantly macrophages and neutrophils compared with CS group ($p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectively). MPO levels was increased in CS (526.5 ± 34.72 mU/mg ptn, $p < 0.01$), but was shown to be reduced in CS+P (385.1 ± 27.64 mU/mg ptn, $p < 0.05$) compared with Control+P (134 ± 12.99 mU/mg ptn, $p < 0.001$), similar pattern was found in antioxidant enzymes: SOD (Control+P: 523.5 ± 29.6 U/mg ptn; CS: 523.5 ± 29.6 U/mg ptn, $p < 0.001$; CS+P: 246.8 ± 15.69 U/mg ptn, $p < 0.001$), CAT (Control+P: 37.38 ± 3.39 U/mg ptn; CS: 92.68 ± 6.24 U/mg ptn, $p < 0.001$; CS+P: 59.84 ± 4.55 U/mg ptn, $p < 0.05$) and GPx (Control+P: 2.23 ± 0.17 ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg ptn}) \times 10^{-1}$; CS: 4.51 ± 0.31 ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg ptn}) \times 10^{-1}$, $p < 0.001$; CS+P: 2.64 ± 0.19 ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg ptn}) \times 10^{-1}$, $p < 0.05$) and different from GSH/GSSG ratio (Control+P: 1.088 ± 0.17 ; CS: 0.736 ± 0.07 , $p < 0.05$; CS+P: 1.258 ± 0.10 , $p < 0.05$). MDA (Control+P: 0.266 ± 0.05 nMol/mg ptn; CS: 0.94 ± 0.076 nMol/mg ptn, $p < 0.001$; CS+P: 0.498 ± 0.06 nMol/mg ptn, $p < 0.01$) and nitrite levels (Control+P: 50.01 ± 4.19 $\mu\text{Mol}/\text{mg ptn}$; CS: 108.7 ± 7.73 $\mu\text{Mol}/\text{mg ptn}$, $p < 0.001$; CS+P: 58.84 ± 3.42 nMol/mg ptn, $p < 0.01$) increased in CS group when compared with other groups. TNF- α expression was observed in CS only. P administration showed an antioxidant action in murine macrophages and reduced cigarette smoke-induced lung inflammation and oxidative stress, probably, by action of its phytochemical compounds actions.

Keywords: Propolis. Murine macrophages. Cigarette smoke. Inflammation. Oxidative stress. Lung.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema apresentando os eventos envolvidos no desenvolvimento da inflamação e do estresse oxidativo causado pela fumaça de cigarro.....	20
Figura 2 – Esquema apresentando as ações da própolis sobre diversos estímulos prejudiciais aos pulmões	25
Figura 3 – Os constituintes fitoquímicos presentes na própolis.....	39
Tabela 1 – Identificação dos compostos químicos presentes no extrato etanólico da própolis.....	40
Figura 4 – Os níveis de polifenóis totais presentes na própolis.....	41
Figura 5 – A influência da própolis sobre a viabilidade celular.....	42
Figura 6 – O potencial antioxidante da própolis.....	43
Figura 7 – A ação da própolis sobre os níveis de ROS.....	44
Figura 8 – A influência da própolis sobre o dano oxidativo.....	45
Figura 9 - Análise histológica pulmonar.....	46
Figura 10 – Contagem diferencial de células.....	47
Figura 11 – Níveis de mieloperoxidase (MPO).....	48
Figura 12 – Níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD).....	49
Figura 13 - Níveis de atividade da catalase (CAT).....	50
Figura 14 - Níveis de atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	51
Figura 15 – Relação glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG).....	52
Figura 16 – Níveis de malondialdeído (MDA).....	53
Figura 17 – Níveis de nitrito.....	54
Figura 18 – Expressão de TNF- α	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSTFA	N, O-bis(trimetilsilil)fluoroacetamida
CAPE	Ácido cafeico fenetil ester
CAT	Catalase
CCR6	Receptor 6 de quimiocina (C-C motif.)
COX	Ciclooxigenase
CS	Fumaça de cigarro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EPP	Extrato alcoólico de própolis
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito/macrófago
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GSH/GSSG	Relação glutaciona reduzida e glutaciona oxidada
HSP70	Proteína de choque térmico 70
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon-gama
I κ B	Inibidor do kappa B
I κ B α	Inibidor kappa B alfa
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
JNK	Jun N-terminal cinase
KOH-DMSO	Solução de hidróxido de potássio com dimetilsulfóxido
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipolissacarídeo
LT	Leucotrieno

MAPK	Proteína-cinase ativado por mitógenos
MCP-1	Proteína-1 quimiotática de monócitos
MDA	Malondialdeído
MIP-3 α	Proteína inflamatória de macrófagos-3 alfa
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NOS 2	Óxido nítrico sintase induzida
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintase
OVA	Ovalbumina
P	Própolis
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGF _{2α}	Prostaglandina F2 α
ROS	Espécies reativas de oxigênio totais
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SOD	Superóxido dismutase
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TNB	2-nitro-5-tiobenzoato
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa
u.a.	Unidades arbitrárias

LISTA DE SIMBOLOS

AlCl_3	Cloreto de alumínio
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
μm	Micrômetro
$-\text{SH}$	Radical sulfidril
HOCl	Ácido hipocloroso
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{OH}\cdot$	Radical hidroxila
OONO^-	Peroxinitrito
O_2	Oxigênio molecular
O_2^-	Ânion superóxido
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	A FUMAÇA DE CIGARRO E A INFLAMAÇÃO PULMONAR	17
1.1	A fumaça de cigarro e o estresse oxidativo	18
1.2	Terapias voltadas para a inflamação e estresse oxidativo pulmonar	20
1.3	Estudos sobre a Própolis	22
1.4	Própolis e o pulmão	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	METODOLOGIA	27
3.1	Análise fitoquímica da própolis	27
3.2	Estudo <i>in vitro</i>	27
3.2.1	<u>Análise dos níveis de polifenóis totais</u>	28
3.2.2	<u>Teste de viabilidade celular</u>	29
3.2.3	<u>Análise do potencial antioxidante</u>	29
3.2.4	<u>Níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)</u>	30
3.2.5	<u>Determinação do dano oxidativo</u>	30
3.3	Estudo <i>in vivo</i>	31
3.3.1	<u>Animais</u>	31
3.3.2	<u>A exposição à fumaça de cigarro (CS) e procedimentos</u>	31
3.3.3	<u>Análise do lavado broncoalveolar (LBA)</u>	32
3.3.4	<u>Processamento do tecido e contagem de células</u>	33
3.3.5	<u>Homogenato pulmonar</u>	33
3.3.6	<u>Dosagem de proteínas</u>	34
3.3.7	<u>Mieloperoxidase (MPO)</u>	34
3.3.8	<u>Superóxido dismutase (SOD)</u>	35
3.3.9	<u>Catalase (CAT)</u>	35
3.3.10	<u>Glutathione peroxidase (GPx)</u>	35
3.3.11	<u>Sistema Glutathione</u>	36
3.3.12	<u>Determinação do dano oxidativo</u>	37

3.3.13	<u>Determinação dos níveis de nitrito</u>	37
3.3.14	<u>Western Blotting</u>	37
3.4	Análises estatísticas	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Os constituintes fitoquímicos presentes na própolis	39
4.2	Os níveis de polifenóis totais presentes na própolis	41
4.3	A influência da própolis sobre a viabilidade celular	42
4.4	O potencial antioxidante da própolis	43
4.5	A ação da própolis sobre os níveis de ROS	44
4.6	A influência da própolis sobre o dano oxidativo	45
4.7	Influência da Própolis (P) no parênquima pulmonar e na contagem de células inflamatórias	47
4.8	Efeitos da Própolis sobre a mieloperoxidase (MPO)	48
4.9	Efeitos da Própolis sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD)	49
4.10	Efeitos da Própolis sobre a atividade da catalase (CAT)	50
4.11	Efeitos da Própolis sobre a atividade da glutathione peroxidase (GPx)	51
4.12	Ação da Própolis sobre a relação GSH/GSSG	52
4.13	Efeitos da administração da Própolis sobre os níveis de MDA	53
4.14	A ação da Própolis nos níveis de nitrito (NO₂⁻)	54
4.15	Efeitos da Própolis na expressão de TNF-α	55
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	APENDICE A - Declaração da Comissão de Ética para cuidado e uso de animais experimentais	70
	APÊNDICE B – Carta de submissão do artigo do mestrado para a revista Evidence-based Complementary and Alternative Medicine	71
	APÊNDICE C - Carta de aceitação de publicação de artigo para a revista Food International Research	72
	APÊNDICE D – Artigo aceito para publicação durante ao período de mestrado	73

APÊNDICE E – Artigo publicado durante ao período de mestrado – I	83
APÊNDICE F – Artigo publicado durante ao período de mestrado – II	94
APÊNDICE G – Artigo publicado durante ao período de mestrado – III	106
APÊNDICE H – Carta de aceitação de apresentação de resumo em congresso: 10 th International Congress on Cell Biology	115
APÊNDICE I – Certificado de participação em congresso internacional – I	116
APÊNDICE J – Certificado de participação em congresso internacional – II	117
APÊNDICE K – Certificado de participação em congresso internacional – III	119
APÊNDICE L – Certificado de participação em congresso internacional – IV	123
APÊNDICE M – Certificado de participação em congresso nacional – I	126
APÊNDICE N – Certificado de participação em congresso nacional – II	127
APÊNDICE O – Certificado de participação em congresso nacional – III	128