

INTRODUÇÃO

As doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) são caracterizadas por uma redução do fluxo de ar, causada pelo estreitamento ou obstrução das vias aéreas, como o enfisema e a bronquite crônica (Bargagli, Olivieri *et al.*, 2009). Em relação a estas doenças, o tabagismo (hábito do qual o cigarro é o maior representante) foi reconhecido como um problema de saúde pública em 1950 (Doll e Hill, 1950).

Levantamentos estatísticos da OMS entre 2001 e 2009 revelaram que cerca de 6 milhões de pessoas morrem em decorrência do cigarro em todo o mundo (Who, 2011). No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostraram que o consumo de tabaco é um hábito de 17,5% da população brasileira, o que corresponde a 25 milhões de pessoas, a partir da idade de 15 anos (Brasil, 2011).

O uso do cigarro leva o usuário a ter contato com uma série de substâncias como nicotina e seus metabólitos e o monóxido de carbono, além de outras 4800 diferentes substâncias (Roethig, Munjal *et al.*, 2009). Ao contato com o pulmão, a fumaça de cigarro causa um processo inflamatório caracterizado por um influxo de células inflamatórias e produção de mediadores inflamatórios (Roth, 2008), além do estresse oxidativo (Mak, 2008).

A fim de combater a inflamação e o estresse oxidativo causada pela exposição à fumaça de cigarro, diversos estudos tem buscado o uso de fármacos como N-acetilcisteína (NAC) (Liao, Chi *et al.*, 2010); vitaminas C e E (Valenca, Bezerra *et al.*, 2008) e produtos naturais como o mate (Lanzetti, Bezerra *et al.*, 2008), encontrando alternativas de tratamento.

Observando a própolis, produto resinoso produzido por abelhas, ela possui ações anti-inflamatórias, antioxidantes e imunomoduladoras (Ahn, Kumazawa *et al.*, 2004; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas *et al.*, 2008). Entretanto, há poucos estudos voltados ao sistema respiratório.

1 A FUMAÇA DE CIGARRO E A INFLAMAÇÃO PULMONAR

A inflamação pulmonar é um processo imunológico estimulado por diversos fatores ambientais como a fumaça de cigarro (Mitchell, Stanford *et al.*, 1976) e a poluição do ar (Dohan e Taylor, 1960). Esse fenômeno é caracterizado pelo influxo de células inflamatórias como os neutrófilos e macrófagos, que contribuem na propagação do processo inflamatório e do dano tecidual provocado pela fumaça de cigarro (O'donnell, Breen *et al.*, 2006).

Estudos investigaram o papel da fumaça de cigarro na indução da inflamação pulmonar e dos mecanismos celulares envolvidos nesta. Um desses mecanismos seria a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), responsável pela transcrição dos genes de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Ghosh e Hayden, 2008). Isto foi observado no trabalho que utilizou a exposição de fumaça de cigarro “light” durante sessenta dias (Valenca, Castro *et al.*, 2006).

Além do envolvimento da ativação do NF- κ B, foi observado no trabalho de Bracke e colaboradores que o receptor de citocinas CCR6 e seu ligante, a proteína inflamatória de macrófagos-3 α , o MIP-3 α estão envolvidos na resposta inflamatória causada pela fumaça de cigarro. Estes elementos estão presentes em vários tipos celulares como os neutrófilos ativados por citocinas, os linfócitos B e as células dendríticas imaturas. Além disso, foi observada a importância desse receptor e do seu ligante na liberação de outras moléculas pró-inflamatórias como o TNF- α e da molécula quimiotática de monócitos (MCP-1). Estas moléculas são importantes para o aumento de influxo de células de defesa para os alvéolos pulmonares (Bracke, D'hulst A *et al.*, 2006).

Os mediadores inflamatórios, como as citocinas, são importantes para a mediação do processo inflamatório provocado pela fumaça de cigarro. Foi observado que a interleucina 1 β (IL-1 β) promove o aumento no influxo de células inflamatórias com consequentes alterações na arquitetura do parênquima pulmonar; há o aumento dos níveis de outras moléculas pró-inflamatórias como a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e de enzimas chamadas de metaloproteinases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12), que são envolvidas no remodelamento tecidual das vias aéreas no enfisema (Lappalainen, Whitsett *et al.*, 2005).

Além da ação das citocinas, a inflamação pulmonar provocada pela fumaça de cigarro provoca alterações nos níveis de óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula que possui várias ações no pulmão como a de relaxar a musculatura lisa dos brônquios e dos vasos, auxiliar na neurotransmissão e na produção de muco pelas vias aéreas. A sua produção é feita pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS 2), localizada no endotélio dos vasos pulmonares (Dweik, 2007).

Na inflamação pulmonar, sabe-se que a fumaça de cigarro atua na diminuição dos níveis de óxido nítrico em uma exposição aguda em pulmões de camundongos (Valenca, Pimenta *et al.*, 2009) e na exposição passiva por seres humanos (Yates, Breen *et al.*, 2001), levando o aumento do processo inflamatório. Isto pode ser provocado pela ação da fumaça de cigarro sobre a expressão da enzima óxido nítrico sintase (Barbera, Peinado *et al.*, 2001; Ferrer, Peinado *et al.*, 2009).

1.1 A fumaça de cigarro e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um fenômeno caracterizado pelo desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as de nitrogênio (ERNs) em relação aos níveis de antioxidantes e pelo dano oxidativo (Bargagli, Olivieri *et al.*, 2009), caracterizado pela alteração estrutural e funcional de biomoléculas como lipídeos de membrana (Wijnhoven, Heunks *et al.*, 2006), proteínas (Umstead, Freeman *et al.*, 2009) e DNA (Speina, Arczewska *et al.*, 2005).

As EROs são moléculas presentes em diversas doenças. A produção de EROs se inicia na mitocôndria, onde a redução incompleta do oxigênio molecular (O_2) durante a cadeia respiratória promove a geração do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A partir deste radical livre, outras EROs são produzidas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007), enquanto as ERNs são moléculas que são geradas a partir do NO e de seus metabólitos (Masri, Comhair *et al.*, 2005).

Além disso, foi observada a produção de EROs e ERNs por fontes endógenas como as células inflamatórias, especialmente pelos fagócitos quando estimulados pela fumaça de cigarro (Reddy, 2008). A produção endógena de EROs e ERNs feita

por macrófagos é um exemplo. Eles produzem o $O_2^{\bullet-}$ através da depleção da L-arginina pela NOS 2. Além disso, a interação do $O_2^{\bullet-}$ com o NO leva a formação do peroxinitrito ($ONOO^-$), uma molécula altamente reativa com as macromoléculas do organismo (Xia e Zweier, 1997).

A fumaça de cigarro é constituída por diversas substâncias, com ação oxidante, como o H_2O_2 , que é gerado durante a queima do cigarro (Takanami, Moriyama *et al.*, 2009). Sabe-se também que o H_2O_2 atua na via de sinalização de morte celular via TNF- α . Esta via de sinalização é baseada na ação oxidativa dessa ERO sobre as fosfatases da proteína-cinase ativada por macrófagos (MAPK), principalmente sobre as cisteínas presentes no seu sítio catalítico, diminuindo, assim, a ação dessas proteínas e permitindo a ativação da via cinase Jun N-terminal (JNK), importante via de morte celular (Kamata, Honda *et al.*, 2005).

Os agentes oxidantes da fumaça de cigarro contribuem para o desenvolvimento do estresse oxidativo. Isto pode ser verificado pela alteração dos níveis de atividades das enzimas antioxidantes e pelo aumento dos níveis de malondialdeído, produto da peroxidação lipídica, em diversos órgãos (Rueff-Barroso, Trajano *et al.*, 2010). No caso do sistema pulmonar, foi observada a presença de EROs e ERNs em doenças relacionadas com o tabaco como o caso do enfisema (Rangasamy, Misra *et al.*, 2009).

Um trabalho estudou como a resposta pulmonar à exposição à fumaça de cigarro se diferencia do estímulo dado por inalação de lipolissacarídeo (LPS) durante cinco dias. Esse trabalho demonstrou diferentes respostas na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), tanto no tecido quanto no lavado broncoalveolar (BAL). Os níveis de malondialdeído (MDA), indicador de dano oxidativo, foi maior no grupo exposto à fumaça de cigarro do que ao LPS (Valenca, Silva Bezerra *et al.*, 2008).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo que possui um importante papel como agente antioxidante devido ao radical sulfidril (-SH) presente na sua estrutura. A GSH é uma importante molécula contra a ação de oxidantes presentes na inflamação e lesão pulmonar (Rahman e Macnee, 1999). A fumaça de cigarro propicia a depleção da GSH, levando a diminuição dos seus níveis em fibroblastos pulmonares no qual níveis crescentes de extrato de fumaça de cigarro (1 a 10%) levaram a níveis decrescentes de GSH (Carnevali, Petruzzelli *et al.*, 2003). O

panorâma geral das ações pró-inflamatórias e pró-oxidantes da fumaça de cigarro podem ser observadas no esquema a seguir:

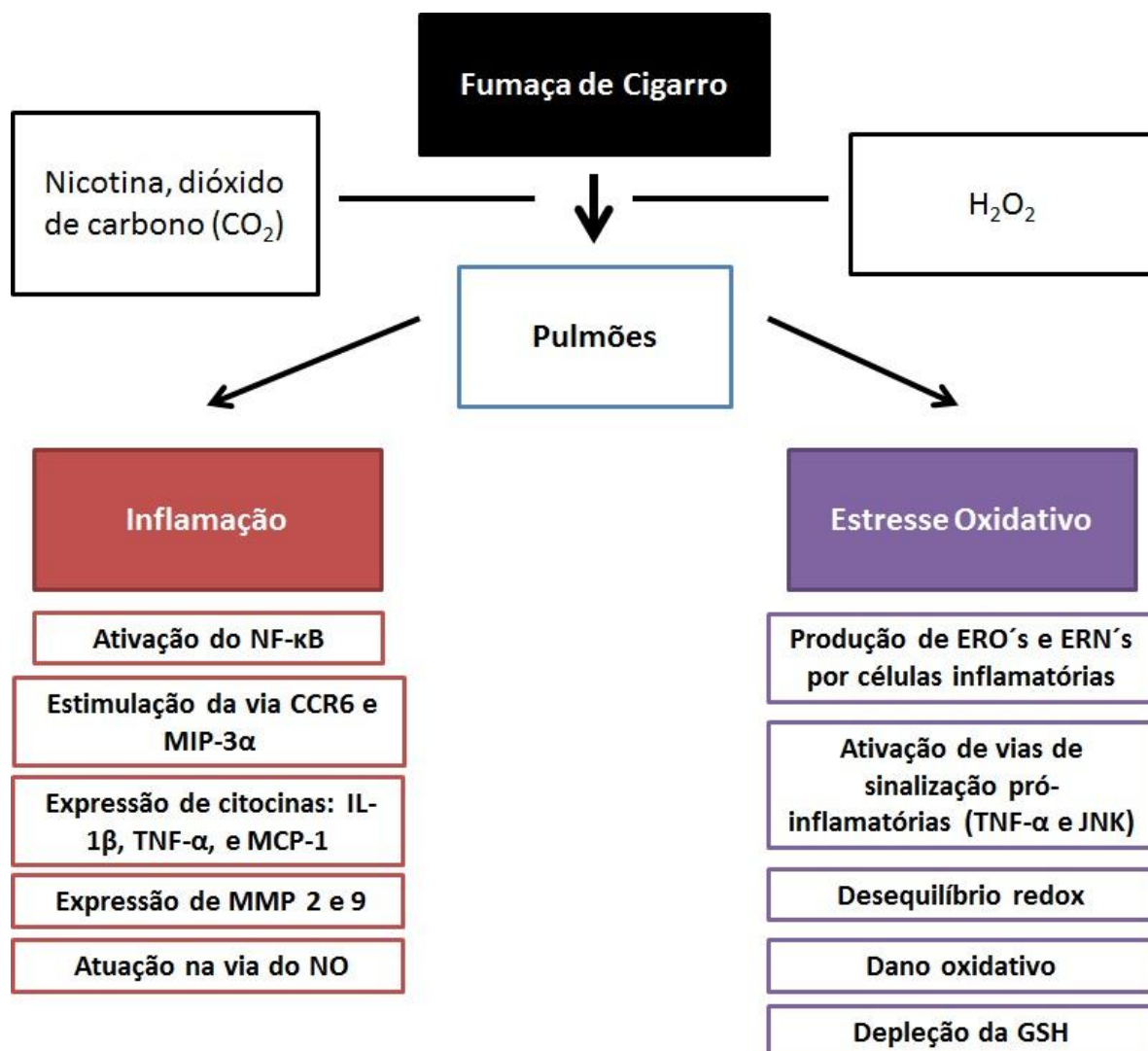


Figura 1. Esquema apresentando os eventos envolvidos no desenvolvimento da inflamação e do estresse oxidativo causado pela fumaça de cigarro. Esquema feito pelo autor da dissertação.

1.2 Terapias voltadas para a inflamação e estresse oxidativo pulmonar

A busca de meios de combate à inflamação e o estresse oxidativo pulmonar induzido pela fumaça de cigarro tem sido o alvo de diversos estudos científicos. O uso de diversas substâncias como N-acetilcisteína (NAC), ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E), polifenóis e flavonóides foi realizado e com

resultados promissores tanto a nível bioquímico quanto funcional na inflamação pulmonar (Rahman, 2006).

A NAC é um fármaco conhecido por suas propriedades antioxidantes. Estudo com camundongos expostos à fumaça de cigarro durante 60 dias demonstrou que esse fármaco possui propriedades protetoras à estrutura do parênquima pulmonar (Valenca, Rueff-Barroso *et al.*, 2011). Outro estudo mostra o envolvimento da NAC e de sua possível ação sobre as células de Clara em ratos expostos à fumaça de cigarro. Nesse estudo, foi observado que com o tratamento com a NAC houve aumento do nível de GSH no plasma, melhora com relação ao quadro patológico estabelecido pela fumaça de cigarro e o aumento de partículas presentes dentro das células de Clara (Liao, Chi *et al.*, 2010). Além disso foi observado que o tratamento da própolis com a NAC em macrófagos alveolares de ratos expostos ao extrato de fumaça de cigarro apresentou efeito anti-inflamatório ao reduzir a expressão do NF- κ B (Pires, Lanzetti *et al.*, 2012).

Além da NAC, outros estudos mostram efeitos de outros fármacos sobre os efeitos da fumaça de cigarro no pulmão. O tratamento de camundongos expostos à fumaça com aspirina e indometacina, que são inibidores não-seletivos das enzimas ciclooxigenase (COX) 1 e 2 e potentes antiinflamatórios, mostraram a diminuição do influxo de neutrófilos e a redução da ativação de importantes vias como p38MAPK e do NF- κ B induzidas pela fumaça (Castro, Nasser *et al.*, 2009). Um trabalho realizado com a sinvastatina, que é uma estatina que possui efeitos pleotrópicos como antiinflamatório, antioxidante e antitrombogênico, mostrou que animais expostos à fumaça de cigarro e tratados com sinvastatina apresentaram inibição do desenvolvimento do enfisema através da diminuição da destruição do parênquima pulmonar, o tratamento com a estatina inibiu a infiltração de células inflamatórias, principalmente mononucleares, ao redor dos vasos e das árvores brônquicas, a formação de uma hipertensão pulmonar e a expressão de MMP-9, evitando o dano tecidual (Lee, Lee *et al.*, 2005).

Outros estudos voltados à ação antioxidante das vitaminas C e E foi realizado em camundongos expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias. Foi observada a diminuição do infiltrado de células inflamatórias, diminuição do dano oxidativo causado pela fumaça e a diminuição da expressão de NF- κ B (Silva Bezerra, Valenca *et al.*, 2006). E outro estudo do mesmo grupo mostrou que a suplementação com as vitaminas C e E, em camundongos expostos à fumaça de cigarro durante sessenta

dias, diminuiu o número de neutrófilos estimulados pelo TNF- α e restabeleceu o equilíbrio redox, recuperando os níveis de atividade de SOD e CAT em relação ao grupo exposto à fumaça de cigarro (Valenca, Bezerra *et al.*, 2008).

O estudo envolvendo o uso de resveratrol, um constituinte do vinho tinto e que possui ações antiinflamatórias e antioxidantes, em pacientes com DPOC, mostra uma inibição da liberação de IL-8 e do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) aos níveis basais e pela estimulação via IL-1 β (Culpitt, Rogers *et al.*, 2003). Foi observado também que o tratamento com o extrato da casca da uva em camundongos C57Bl/6 expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias obtiveram diminuição dos níveis de MMP-9, do influxo de células inflamatórias e do dano oxidativo representado pelos níveis de MDA (Pires, Valenca *et al.*, 2011).

E o uso do chá mate (infusão de *Ilex paraguariensis*) em animais expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias levou a redução do número de macrófagos alveolares e de neutrófilos no BAL, além da redução do dano oxidativo, dos níveis de TNF- α e da atividade da MMP-9, mostrando o efeito antiinflamatório e antioxidante do chá mediante esse tipo de estímulo (Lanzetti, Bezerra *et al.*, 2008). Outro estudo do mesmo grupo mostrou que após a exposição de camundongos à fumaça de cigarro durante 60 dias mostrou a ação anti-inflamatória do chá mate através da diminuição da atividade da mieloperoxidase (MPO) e antioxidante através da diminuição do dano oxidativo através dos níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE), aumentando a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e os níveis de GSH em relação à GSSG (Lanzetti, Lopes *et al.*, 2011).

1.3 Estudos sobre a própolis

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas (*Apis mellifera*) a partir de exudatos e botões florais de plantas. Acredita-se que a própolis sirva para proteger a colméia contra predadores (Ahn, Kumazawa *et al.*, 2004). A própolis é composta por resina (50%), cera (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outros compostos orgânicos (5%). Além disso, a própolis possui na sua constituição

flavonóides, compostos fenólicos e ésteres, terpenoídes, esteróides e aminoácidos (Viuda-Martos, Ruiz-Navajas *et al.*, 2008). O uso da própolis pelos seres humanos é descrito desde a antiguidade na medicina popular para o tratamento de feridas, a partir da observação de sua ação antiinflamatória (Sforcin, 2007). Atualmente, a própolis vem sendo estudada para diversos fins; foram observados efeitos antiinflamatório (Hu, Hepburn *et al.*, 2005; Tan-No, Nakajima *et al.*, 2006), imunomodulador (Sa-Nunes, Faccioli *et al.*, 2003), antimetastático (Orsolich, Knezevic *et al.*, 2004), antiviral (Huleihel e Isanu, 2002), antifúngico (Oliveira, Shinobu *et al.*, 2006), antibacteriano (Boyanova, Derejian *et al.*, 2003), antioxidante (Shimizu, Ashida *et al.*, 2004; Sobocanec, Sverko *et al.*, 2006) e cicatrizante (McLennan, Bonner *et al.*, 2008).

Os efeitos antiinflamatórios da própolis foram observados, através de um estudo de hipersensibilidade de camundongos expostos à ovalbulmina (OVA), que o composto ácido caféico fenetil ester (CAPE) inibiu de forma direta o NF- κ B (Jung, Lee *et al.*, 2008). Além disso, foi observado em um estudo envolvendo o tratamento com a própolis em ratos com edema causado por carragenina que a própolis reduz os níveis de interleucina 6 (IL-6) (Hu, Hepburn *et al.*, 2005) e em um estudo envolvendo a exposição de macrófagos alveolares de camundongos BALB/c foi observado que a própolis estimulou a produção de IL-1 β , inibiu a produção de IL-6 e IL-10 (Bachiega, Orsatti *et al.*, 2012). Estudos também descrevem a ação da própolis sobre a via do NO, isso acontece através da ação da própolis sobre a transcrição, tradução e da atividade da NOS 2, isto foi realizado em macrófagos das linhagens RAW 264.7 e J774A.1 expostos ao EAP (Song, Park *et al.*, 2002; Blonska, Bronikowska *et al.*, 2004).

Os efeitos antioxidantes da própolis são extensos. A própolis atua na regulação do desequilíbrio redox dos sistemas biológicos através dos seus constituintes como as flavonas (Blonska, Bronikowska *et al.*, 2004) e o ácido caféico (Jung, Lee *et al.*, 2008). A própolis diminui o dano oxidativo representado pela peroxidação lipídica em ratos Wistar expostos cloreto de alumínio (AlCl₃) (Newairy, Salama *et al.*, 2009) e dano ao DNA no esperma humano exposto ao composto benzo(a)pireno (Russo, Troncoso *et al.*, 2006). Esses efeitos podem ser entendidos pela ação “scavenger” da própolis sobre as EROs. Este fenômeno pode ser caracterizado de duas formas: 1) a ação direta do ácido caféico sobre EROs

(Nakajima, Tsuruma *et al.*, 2009) e/ou 2) estimulação da própolis sobre a atividade das enzimas antioxidantes (Fuliang, Hepburn *et al.*, 2005).

1.4 Própolis e o pulmão

Os estudos com própolis voltados ao pulmão e às suas doenças são poucos, entretanto mostram como o efeito da própolis é benéfico com sua ação sobre a asma. Estes trabalhos observaram que a própolis melhora o quadro clínico da doença através da diminuição dos ataques noturnos e da melhoria da função pulmonar, além das alterações no quadro inflamatório através da diminuição dos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-8, aumento dos níveis de IL-10, diminuição dos níveis de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e dos derivados do metabolismo do ácido araquidônico como leucotrienos (LT's) e prostaglandinas (PGE₂ e PGF_{2 α}) (Khayyal, El-Ghazaly *et al.*, 2003).

Isso pode ser confirmado através do estudo *in vitro* com células dendríticas derivadas de monócitos humanos expostos a um extrato de ácaro e tratados com própolis onde foi observado que a própolis inibiu a fosforilação do inibidor do κ B-alfa (I κ B α) e do NF κ B, o que levou a diminuição dos níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias (Wang, Lin *et al.*, 2009). O mesmo resultado foi visto no modelo *in vitro* de inflamação por irradiação, caracterizado pela diminuição da expressão de TNF- α , do fator transformante do crescimento beta (TGF- β) e da interleucina 1 (IL-1) (Chen, Keng *et al.*, 2005).

Além disso, há estudos voltados para inflamação na endotoxemia causada por LPS (Koksel, Ozdulger *et al.*, 2006) e animais com sepse (Fidan, Sahin *et al.*, 2007). Foram observados nestes trabalhos, respectivamente, a melhora das lesões histológicas no pulmão e da sobrevivência dos animais. No primeiro trabalho, foi visto a diminuição dos níveis da enzima mieloperoxidase, que é uma enzima produzida e utilizada pelos neutrófilos no combate as bactérias (Schmekel, Karlsson *et al.*, 1990), levando a diminuição do dano oxidativo na célula causado pelo produto da MPO, o

ácido hipocloroso (HOCl) e no segundo trabalho, a diminuição da apoptose das células, da iNOS e da proteína de choque térmico 70 (HSP70).

Com relação à ação antioxidante da própolis nos pulmões, foi observado que a própolis auxilia no combate ao desequilíbrio redox causado por hiperóxia (100% de oxigênio normobárico) através do aumento dos níveis da atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e no dano oxidativo através da diminuição dos níveis da peroxidação lipídica (Sobocanec, Sverko *et al.*, 2006).

As consequências vistas pelos diversos tipos de estímulos prejudiciais ao sistema respiratório apresentados acima se mostram revertidos ou diminuídos através das ações da própolis. Entretanto, não foram observados na literatura estudos voltados para a utilização da própolis no tratamento e no entendimento de suas funções sobre a inflamação e o estresse oxidativo em pulmões de camundongos expostos à fumaça de cigarro.

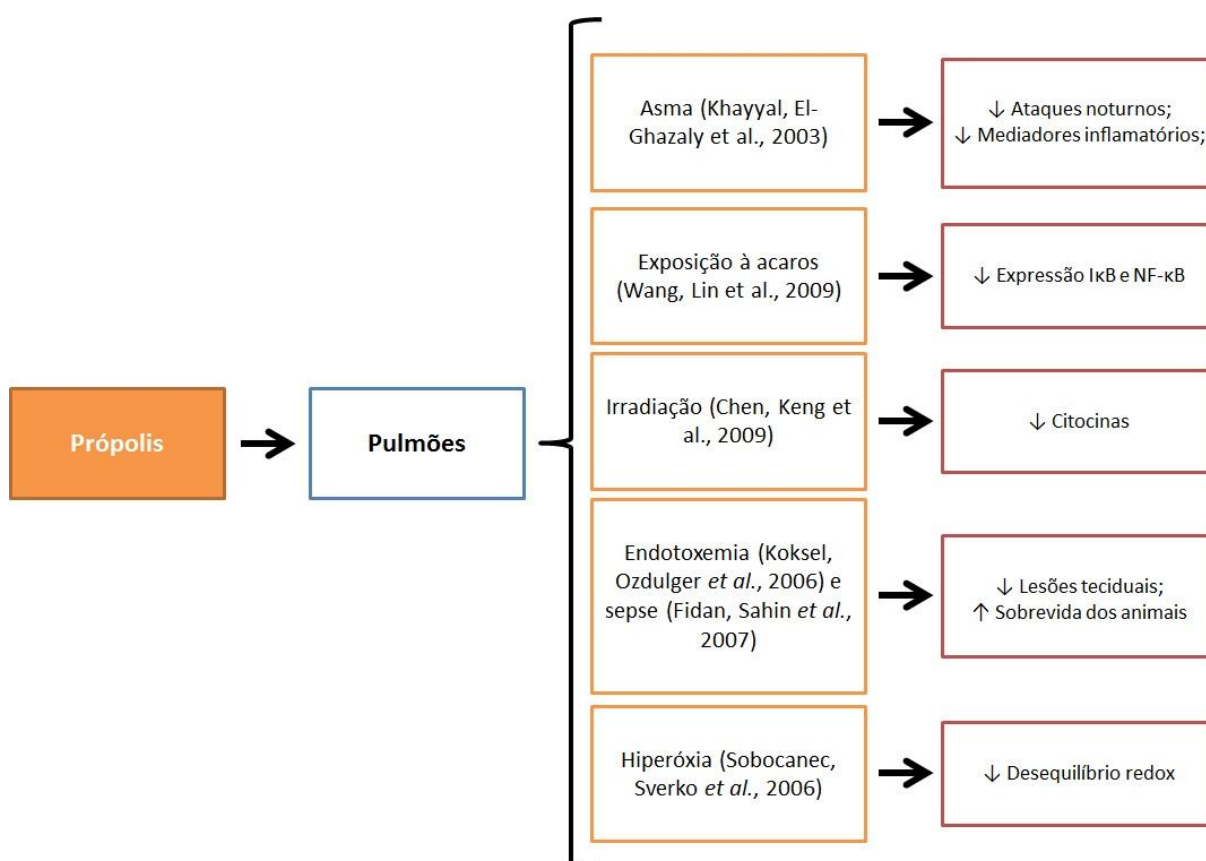


Figura 2 - Esquema apresentando as ações da própolis sobre diversos estímulos prejudiciais aos pulmões. Esquema feito pelo autor da dissertação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da própolis em camundongos expostos à fumaça de cigarro e em macrófagos murinos RAW 264.7.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise fitoquímica da própolis por CG-MS e Folin-Ciocalteu;
- Analisar a histologia e a contagem de células inflamatórias do pulmão;
- Realizar as análises bioquímicas do equilíbrio redox (superóxido dismutase [SOD], catalase [CAT] e glutathione peroxidase [GPx]);
- Realizar as análises bioquímicas do estresse oxidativo (glutathione reduzida [GSH] e glutathione oxidada [GSSG]);
- Realizar a análise bioquímicas do dano oxidativo (malondialdeído);
- Realizar as análises bioquímicas da inflamação (mieloperoxidase e NO_2^-);
- Realizar a análise biomolecular da inflamação (fator de necrose tumoral-alfa [TNF- α]);
- Analisar o efeito redutor da própolis (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e espécies reativas de oxigênio totais [ROS]);
- Analisar a viabilidade celular (MTT).

3 METODOLOGIA

3.1 Análise química da própolis

O extrato etanólico da própolis de origem comercial (Coapi, São Gonçalo, RJ, Brasil) foi evaporado e 100 µL de N, O-bis(trimetilsilil)fluoroacetamida (BSTFA) foi adicionado para cada 1,6 mg de resíduo. Após 30 minutos, a solução foi injetada (1 µL) no sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) (Shimadzu QP5050) equipado com a coluna de 5% fenil-metilpolisiloxano (25 m x 0,25 mm, 25 µm de filme de fase líquida). Hélio foi utilizado como gás carreador. As condições das análises foram as seguintes: as temperaturas de injeção e interface foram 280 e 250°C, respectivamente; a coluna foi aquecida de 80°C para 310°C em 5°C/min. Os dados de MS foram adquiridos em modo *full scan*, a varredura completa dos compostos, (*mass range* 40-800 amu) em 2,9 scans/s, com a multiplicador de tensão de 2 kV e a energia de ionização de 70 eV.

3.2 Estudo *in vitro*

Neste estudo foi utilizada a linhagem de células de macrófagos de origem tumoral de murinos RAW 264.7. As células foram cultivadas em meio DMEM/solução de Ham's (1:1) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina (100 U/mL) e estreptavidina (100 µg/mL) (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). No experimento, as células foram utilizadas quando alcançavam a confluência de 80 a 90%. As células foram tratadas com diversas concentrações de própolis oriundas da solução de própolis (P) a 125 mg/mL diluídas com o meio completo adicionado com 1% de soro fetal bovino e a partir disso, grupos foram formados, conforme a seguir:

- **Controle (CTR)** – Células em meio completo com 1% SFB;
- **0,98mg/mL** – Células em meio completo e tratadas com 0,98mg/mL de P;

- **1,95mg/mL** - Células em meio completo e tratadas com 1,95mg/mL de P;
- **3,9mg/mL** - Células em meio completo e tratadas com 3,9mg/mL de P;
- **7,8mg/mL** - Células em meio completo e tratadas com 7,8mg/mL de P;
- **15,6mg/mL** - Células em meio completo e tratadas com 15,6mg/mL de P;
- **31,2mg/mL** - Células em meio completo e tratadas com 31,3mg/mL de P;
- **62,5mg/mL** - Células em meio completo e tratadas com 62,5mg/mL de P;
- **125mg/mL** - Células em meio completo e tratadas com 125mg/mL de P;

Os experimentos foram realizados nas placas de 96 poços e de 24 poços, sendo que em cada grupo, as células estavam distribuídas em cinco poços. Cada poço conteve 1×10^5 e 5×10^5 células, correspondendo ao tipo de placa utilizado, respectivamente. Os experimentos foram repetidos três vezes. A própolis utilizada no estudo é de origem comercial (Propomax®, Apis Flora, Ribeirão Preto, SP).

3.2.1 Análise dos níveis de polifenóis totais

As células RAW 264.7 (5×10^5 células/poço) foram tratadas com diferentes diluições de própolis em placa de 24 poços durante 24 horas. Após esse tempo, o meio condicionado foi coletado e nesta análise de Folin-Ciocateau foi realizada para determinar os níveis de polifenóis (Singleton e Rossi, 1965). As amostras de meio condicionado (100 μ L), em duplicata, foram misturadas à solução de Folin-Ciocateau e de carbonato de sódio em tubos de ensaio. As amostras foram colocadas em repouso durante duas horas. Após esse procedimento, as amostras foram colocadas na placa de 96 poços (200 μ L) e foi feita a leitura em 700 nm. A curva padrão, feita com diversas concentrações de ácido gálico, passou pelo mesmo processo descrito acima. Os valores de polifenóis totais são apresentados em mg/mL.

3.2.2 Teste de viabilidade celular

Após 24 horas de tratamento com diferentes diluições da própolis, a análise da viabilidade das células RAW 264.7 (1×10^5 células/poço) foi realizada através do ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil tetrazólio). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços em cinco poços para cada grupo contendo 10^5 células/poço. A solução mãe com 5 mg/mL de MTT foi preparada e adicionada ao meio de cultura, formando uma segunda solução, que foi adicionada a cada poço da placa. Após centrifugação em 7 minutos a 600 g, a placa foi vertida e foram adicionados 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. A leitura foi feita no comprimento de onda de 595nm com o ajuste para 690nm (Reichner, Mulligan *et al.*, 1995). Os valores de viabilidade celular são apresentados em unidades arbitrárias (u.a.).

3.2.3 Análise do potencial antioxidante

A análise do radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil) avalia o potencial redutor de sua substância-alvo. Após 24 horas de tratamento com diferentes diluições de própolis, 20 μ L de meio condicionado de cada poço, em duplicata, foi adicionado a 400 μ L de solução de DPPH a 0,1 μ M em metanol e 400 μ L de tampão fosfato de sódio a 10mM. A mistura foi mantida em repouso, no escuro e temperatura ambiente (21°C), durante uma hora. Após esse tempo, cada amostra, na quantidade de 200 μ L, foi adicionada na placa de 96 poços para a leitura em 520nm. A curva padrão, em duplicata, foi feita com diversas concentrações de DPPH (0 a 100mM) e passou pelos mesmos processos descritos acima. A quantidade de DPPH detectada foi apresentada em μ M/mL (Janaszewska e Bartosz, 2002).

3.2.4 Níveis de espécies de oxigênio reativas totais (ROS)

Os níveis de ROS foram analisados nas células, a análise colorimétrica baseada na reação dos ROS com o sal de nitrotetrazolium (NBT), na concentração de 0,1% (Choi, Kim *et al.*, 2006). As células, após o tratamento com a própolis, foram ressuspensas em 100 µL de KPE e coletadas em eppendorfs, 100 µL de NBT foram adicionados em cada eppendorf. As células foram incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após essa etapa, foram realizadas duas centrifugações a 600 g por 10 minutos e entre elas, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500µL de PBS 1X. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado e misturado à 400µL de solução de KOH+DMSO. A leitura em placa de 96 poços foi feita em 630nm. A quantidade de ROS total detectada foi expressa em µg de formazan/ 10⁶ células.

3.2.5 Determinação do dano oxidativo

O dano oxidativo foi avaliado pela concentração de malondialdeído (MDA), utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Draper, Squires *et al.*, 1993). As amostras de meio diferencial (400 µL) foram desproteinizadas com 800 µL de ácido tricloroacético a 10% e centrifugadas em 900 g em 10 min. Após isso, 1.000 µL dos sobrenadantes foram misturados com 1.000µL de 0,67% de ácido tiobarbitúrico.

Cada mistura foi aquecida por 60 min em temperatura de 97°C e depois resfriada em temperatura ambiente. A absorvância da fase orgânica contendo cromógeno rosa foi mensurada espectrofotometricamente em 532nm. O método foi padronizado a partir de concentrações crescentes de MDA. Os valores de MDA foram expressos em nMol/células.

3.3 **Estudo *In vivo***

3.3.1 Animais

No experimento realizado foram utilizados trinta camundongos C57BL/6 machos, com 8 semanas de idade, acondicionados, em grupos de dez animais por caixa, no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) com temperatura e umidade controladas ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19:00-07:00h) e exaustão 15 min/h. Os protocolos de manuseio e experimentação seguiram a “Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008 que trata dos Procedimentos para o Uso Científico de Animais” publicado no Diário Oficial da União (publicação nº 196, seção 1, página 96). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para trabalhos com animais de experimentação – IBRAG – UERJ (nº CEA/023/2009, Apêndice A).

3.3.2 A exposição à fumaça de cigarro (CS) e procedimentos

Durante cinco dias, os animais foram colocados em uma câmara de inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura), dentro de uma capela com exaustor. Vinte animais foram expostos a seis cigarros comerciais ao dia (dois de manhã, dois ao meio-dia e outros dois à tarde). O cigarro foi acoplado em uma seringa de plástico de 60 mL para que a fumaça de cigarro fosse captada e, em seguida, expelida na câmara. Este procedimento foi realizado até que a queima chegasse ao terço terminal do cigarro, que durou em média três minutos. Um litro de fumaça de um cigarro que foi aspirado através da seringa foi diluído em 30L (capacidade da câmara). A concentração de fumaça na câmara foi de 3% durante seis minutos por cigarro. Após este tempo, a câmara foi aberta e a fumaça foi retirada dessa através do exaustor de uma capela durante um minuto e a partir daí, um novo ciclo de exposição à fumaça se iniciava. Todo o protocolo de exposição à fumaça de cigarro foi realizado conforme o modelo já estabelecido pelo grupo

(Valenca, Da Hora *et al.*, 2004). Os animais expostos ao ar ambiente nas mesmas condições foram considerados controle.

O extrato alcóolico de própolis de origem comercial (Coapi, São Gonçalo, RJ, Brasil) foi diluído em salina, diariamente, para obter a dose de 200mg/kg. Nos animais tratados com a própolis, foram administrados 100µL do extrato por gavagem, uma hora após a última inalação (entre 19 e 20 h).

Os animais (n=30) foram divididos em três grupos:

- **Controle + P** (n=10) – animais expostos ao ar ambiente e tratados com própolis (200mg/kg);
- **CS** (n=10) – animais expostos à fumaça de seis cigarros ao dia;
- **CS + P** (n=10) – animais expostos à fumaça de seis cigarros ao dia e tratados com P (200mg/kg).

Durante todo o período de experimento, os animais receberam ração padrão e água *ad libitum*.

3.3.3 Análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Um dia após a última exposição, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O lavado broncoalveolar foi realizado no pulmão esquerdo de todos os animais de cada grupo. Para isto, o pulmão direito foi clampeado e o pulmão esquerdo foi lavado com solução salina (3x 500 µL) através de uma cânula posicionada na traquéia. O líquido foi coletado e estocado em gelo. Após o término de todos os grupos, as amostras foram centrifugadas (Centrifuga Micro FANEM, São Paulo, Brasil) a 600 g por 10 min e o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C para a realização das análises bioquímicas.

3.3.4 Processamento do tecido e contagem de células

Após o LBA, o sangue no tecido pulmonar foi removido através da injeção de salina no ventrículo direito do coração dos animais de todos os grupos. Em seguida, o pulmão esquerdo foi clampeado e o pulmão direito foi inflado com formol tamponado a 4% (pH 7.2) por dois minutos e, então, foi ligado, removido e pesado. Os pulmões inflados foram fixados por 48h e depois, processados e embebidos em parafina. Após a inclusão do material, cortes sagitais de 4 μm foram obtidos dos pulmões direito e foram corados em hematoxilina e eosina (H&E) para análises histológicas. O número total de macrófagos alveolares e neutrófilos foi estimado pela contagem de dez diferentes campos (cinco campos aleatórios de duas lâminas não identificadas). Os campos foram observados com a objetiva de 20x através de um monitor (Philips mod. PV461/781, Manaus, Brasil) ligado a um sistema de vídeo-microscopia (câmera de vídeo colorida JVC mod. TK-C380, Osaka, Japão e microscópio Carl Zeiss mod. Axiolab, Oberkochen, Alemanha) com área total de 24.640 μm^2 .

3.3.5 Homogenato pulmonar

Os pulmões esquerdos de cada grupo foram removidos e imediatamente homogeneizados (Homogeneizador Nova Técnica modelo NT 136, Piracicaba, Brasil) em 1,0 mL de tampão de fosfato de potássio (pH 7,5), centrifugado em 600 g (Centrífuga FANEM modelo 243M, São Paulo, Brasil) em 10 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e ajustados para 1,5 mL com tampão fosfato. As amostras de homogenato de pulmão para a análise de *western blotting* foram desnaturadas em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.001% bromofenol azul) e aquecido em água à 100 °C por três minutos. As amostras foram armazenadas no freezer -20°C para posteriores análises bioquímicas e biomoleculares.

3.3.6 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras de lavado broncoalveolar e de homogeneizado de tecido pelo Método de Bradford (Bradford, 1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga as proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Uma curva padrão foi produzida através de concentrações crescentes da proteína albumina (0,5-10 µl) em triplicata. Para dosagem de proteínas no LBA foi utilizado 30 µl de amostra enquanto para dosagem de proteínas do homogeneizado de pulmão foi utilizado 1 µl de amostra.

3.3.7 Mieloperoxidase (MPO)

Alíquotas do LBA foram utilizadas para dosar os níveis de MPO, uma enzima pró-oxidante liberada por neutrófilos (Schmekel, Karlsson *et al.*, 1990). Os níveis de MPO foram medidos através do uso de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e tampão de acetato de sódio (NaOAc) (Kuebler, Abels *et al.*, 1996). Inicialmente, 100 µL de LBA foram centrifugados com 900 µL de HTAB em 14.000 g durante 15min. A alíquota 75 µL do sobrenadante foi incubado com 5 µL de TMB por 5min em 37°C. A mistura foi incubada com 50 µL de H₂O₂ em 10 min a 37°C, depois disto, foi adicionado 125 µL de tampão de acetato de sódio. A reação foi lida num leitor de microplaca (Bio-Rad mod 550, Hercules, CA) em 630 nm. A atividade enzimática foi expressa em mU/mg proteína total.

3.3.8 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado de pulmão foi determinado de acordo com o método de Bannister e Calabrese (Bannister e Calabrese, 1987). A estimativa da atividade da SOD é feita pela mensuração do nível de inibição da auto-oxidação da adrenalina, que é lida espectrometricamente em 480nm (Beckman Spectrophotometer mod DU 640; Fullerton, CA).

A análise consistiu na utilização de três alíquotas de cada amostra de homogeneizado de pulmão nas seguintes volumes: 20, 40 e 60 µL. A leitura foi realizada adicionando 1920 µL de tampão glicina; 20, 40 e 60µL de amostra; 20 µL de catalase e 40 µL de epinefrina. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e a absorbância foi mensurada a 480 nm em um tempo de 180seg e com intervalos de 10seg. A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína total.

3.3.9 Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) no LBA foi determinada de acordo com a literatura (Aebi, 1984). As alíquotas do BAL utilizadas na análise foram no volume de 100 µL. A leitura consistiu em 1900 µL de tampão fosfato de sódio com peróxido de hidrogênio e 100 µL de amostra. A mistura foi homogeneizada e a medida de sua absorbância foi realizada a partir dos níveis de H₂O₂, lidos em 240 nm, espectrofotometricamente. A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína total.

3.3.10 Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no homogenato pulmonar foi determinado de acordo com o método de Flohé and Gunzler (Flohe e Gunzler, 1984). A GPx é uma enzima antioxidante que atua na catálise do peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) através do auxílio de seu co-fator, a glutathiona reduzida (GSH), que é transformada em glutathiona oxidada (GSSG) após a ação da enzima.

A leitura da enzima consiste em 1000 μ L de tampão fosfato de potássio, 200 μ L de amostra, 200 μ L de GSH, 200 μ L de glutathiona redutase, 200 μ L de NADPH e 200 μ L de H_2O_2 . A mistura foi homogeneizada e sua absorbância foi medida em 340 nm através do espectrofotômetro. A atividade enzimática foi mensurada através da oxidação da NADPH e foi expressa como (μ M/min/mg proteína) $\times 10^{-1}$.

3.3.11 Sistema Glutathiona

A relação glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) é considerada um marcador de estresse oxidativo (Jones, 2002). O ensaio foi baseado na reação da GSH ou GSSG com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) que produz o cromóforo 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) (Rahman, Kode *et al.*, 2006). Para determinar a GSSG, os homogeneizados de pulmão foram tratados com 2-vinilpiridina, que reage covalentemente com a GSH, mas não com a GSSG. O excesso de 2-vinilpiridina foi neutralizado com a trietanolamina. A taxa de formação de TNB, mensurada no espectrofotômetro, é proporcional a concentração de GSH ou GSSG na amostra. A concentração de uma amostra desconhecida é determinada pelo cálculo originado de uma equação linear ou de uma curva de regressão gerada por uma curva padrão da GSH ou da GSSG.

O preparo das amostras para a análise dos níveis de GSH e GSSG foi feito a partir do tratamento de alíquotas de homogeneizado de pulmão com ácido sulfassalicílico na proporção de 1:1 e centrifugadas a 600 g por 10 minutos. Os ensaios foram realizados separadamente e utilizaram 200 μ L do sobrenadante para a leitura da GSH e 200 μ L para a leitura da GSSG. Em seguida, as amostras de GSSG foram incubadas com 4 μ L de 2-vinilpiridina durante uma hora e depois tratadas com trietanolamina para ajustar o pH entre 6,0-7,0. Após o preparo das amostras, a leitura das amostras foi realizada utilizando 1.400 μ L tampão fosfato de potássio, 200 μ L de amostra, 120 μ L de DTNB, 120 μ L de glutathiona redutase e 120 μ L de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH). A mistura foi

homogeneizada e a absorbância foi mensurada em 412 nm, no tempo de 120seg e com intervalos de 30seg.

3.3.12 Determinação do dano oxidativo

O dano oxidativo foi avaliado segundo o método descrito anteriormente na seção 3.2.5. Os valores de MDA foram expressos em nMol/mg proteína total.

3.3.13 Determinação dos níveis de nitrito

Os níveis indiretos de óxido nítrico (NO) foram mensurados pelos níveis de nitrito (NO_2^-), que é um subproduto do metabolismo do NO. O procedimento foi realizado através da reação de Griess (Green, Wagner *et al.*, 1982). Cada uma das amostras do homogeneizado de pulmão (100 μL) reagiu com 50 μL de solução de sulfanilamida 1% por 10 minutos e depois, foi misturado com 50 μL de solução de 0,1% de naftiletilendiamina. No procedimento, ocorre a formação de um composto azo estável de coloração púrpura em que a sua absorbância foi mensurada espectrofotometricamente em 540nm. Os níveis de nitrito foram expressos em $\mu\text{Mol/mg}$ proteína total.

3.3.14 Western blotting

As proteínas total de cada amostra (50 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 15% com SDS separadas por eletroforese, e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Padrão de peso molecular do tipo *rainbow* (Amersham Pharmacia Biotech GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) foram aplicados junto as amostras. As membranas foram bloqueadas com Tween-TBS (20 mM Tris-

HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,5% Tween-20) contendo 2% BSA, e incubado anticorpo primário anti-TNF- α de cabra anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos). Após extensa lavagem em Tween-TBS, a membrana foi incubada com a imunoglobulina G de jumento conjugada com biotina anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology) por uma hora. Então, o complexo antígeno-anticorpos foi detectado com o uso do Reagente de Detecção de Western Electroquimioluminescente (Amersham Pharmacia Biotech GE Healthcare Bio-Sciences Corp.), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 Análises estatísticas

Os valores de todas as análises foram expressos em média \pm erro padrão da média. As diferenças das variáveis entre os grupos nos dados de contagem de células e de GSH/GSSG foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. As diferenças das variáveis entre os grupos nas demais análises foram feitas pelo teste de variância One-way ANOVA. As diferenças entre grupos nas análises de SOD, CAT, GPx e nitrito foram testados pelo pós-teste de Tukey, enquanto que nas análises de MDA e as do estudo *in vitro* foi feito o pós-teste de Bonferroni. A diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Foi utilizado o software *Graphpad Prism* para realização das análises estatísticas (*GraphPad Prism*, versão 5.0, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1. Os constituintes fitoquímicos presentes na própolis

O extrato etanólico da própolis analisada pela GC-MS (Figura 1) mostrou que a própolis possui diversos compostos fenólicos como ácido hidrocinâmico, o ácido coumárico, a drupanina e a artepilina C, sendo o último presente em maior quantidade relativa (17,9%) (Tabela 1). Além disso, a própolis estudada apresentou gorduras como o ácido palmítico, esteárico e oleico e flavonóides, entretanto os seus tipos não foram identificados.

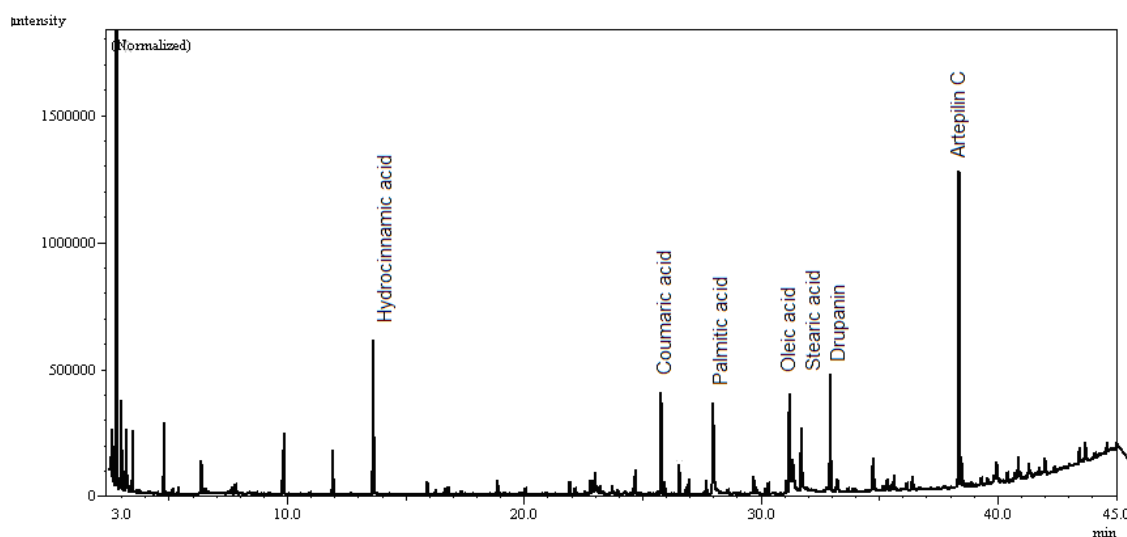


Figura 3 - O cromatograma mostrando os principais compostos fitoquímicos da própolis por GC/MS. O extrato etanólico da própolis foi evaporado e a solução injetada em sistema GC/MS (Shimadzu QP5050 – o gás hélio foi usado como gás carreador e o dado do MS foi adquirido no modo “full scan”). Os derivados silil: os ácidos hidrocinâmico e coumárico (fenólico); ácidos graxos palmítico, oleico e esteárico; e drupanina e artepillina C (ácidos hidroxicinâmicos prenilados) foram detectados.

Tabela 1: Identificação dos compostos químicos presentes no extrato etanólico da própolis.

<i>Identificação</i>	<i>A(%)</i> *	<i>RT(min)</i> **
Ácido hidroxicinâmico	8.3	13.6
Ácido Coumárico	5.8	25.7
Ácido Palmítico	6.3	27.9
Ácido Oleíco	5.9	31.2
Ácido Esteárico	4.0	31.7
Drupanina	6.4	32.9
Artepilina C	17.9	38.3
Total A%	54,6	

*A – Absorbância;

**RT – Tempo de retenção.

4.2. Os níveis de polifenóis totais presentes na própolis

Os níveis de polifenóis presentes na própolis estudada apresentaram-se de forma concentração-dependente (Figura 2) em relação ao grupo CTR, até a concentração 31,2mg/mL e exibindo em concentrações maiores um *plateau*.

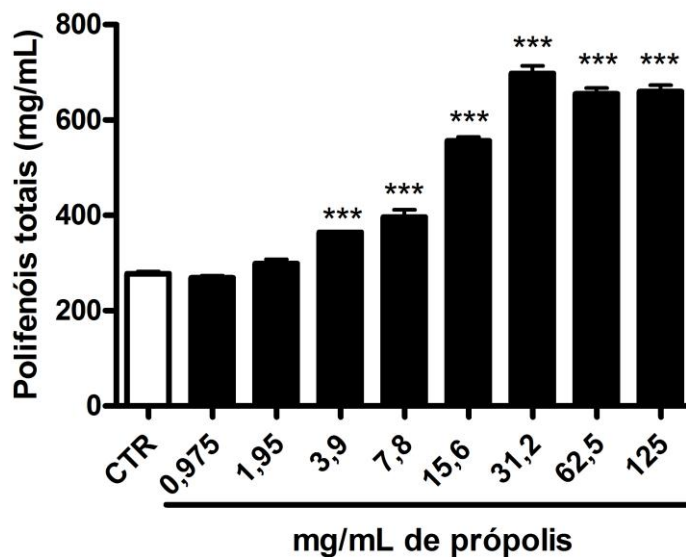


Figura 4 - Os níveis de polifenóis totais da própolis cresce de forma concentração-dependente. As células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM com solução de Ham's (1:1) com 1% de SBF e tratadas com diversas concentrações de própolis durante 24 horas. *** representa o nível de significância estatística de $p < 0,001$.

4.3 A influência da própolis sobre a viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do método do MTT. As células tratadas com a própolis obtiveram um aumento na viabilidade celular de forma concentração-dependente (Figura 3) em relação ao grupo CTR.

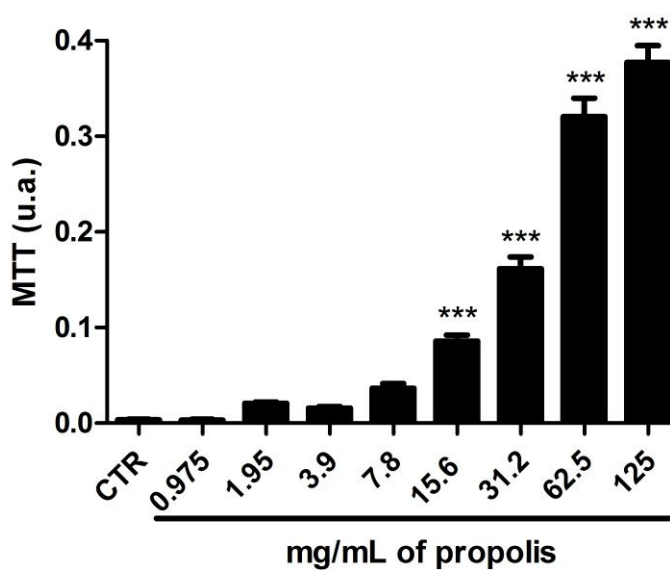


Figura 5 - O aumento da viabilidade celular de forma concentração-dependente. As células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM com solução de Ham's (1:1) com 1% de SBF e tratadas com diversas concentrações de própolis durante 24 horas. *** representa o nível de significância estatística de $p < 0,001$.

4.4 O potencial antioxidante da própolis

A própolis analisada no estudo apresentou níveis menores do radical DPPH nas concentrações entre 0,975 e 31,2 mg/mL em relação aos grupos CTR, 62,5 e 125 mg/mL (Figura 4).

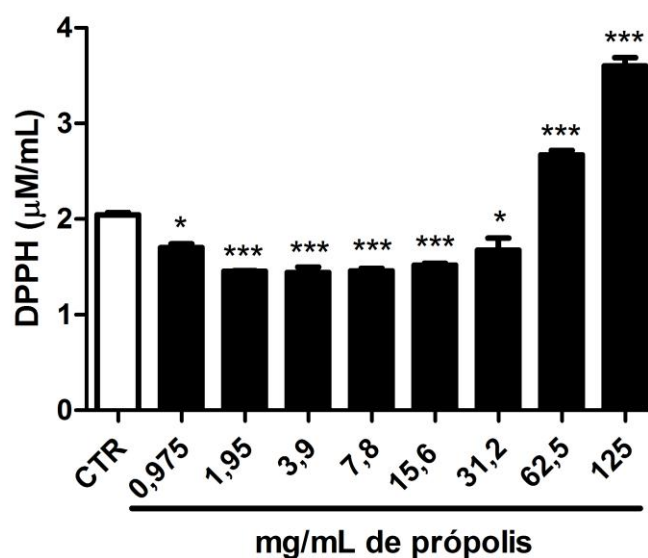


Figura 6 - A atividade antioxidante da própolis está restrita às menores concentrações. As células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM com solução de Ham's (1:1) com 1% de SBF e tratadas com diversas concentrações de própolis durante 24 horas. * representa o nível de significância de $p < 0,05$ e *** representa o nível de significância estatística de $p < 0,001$.

4.5 A ação da própolis sobre os níveis de ROS

Os níveis de ROS sofreram redução apenas nos grupos de 15,6 e 31,2 mg/mL (Figura 5).

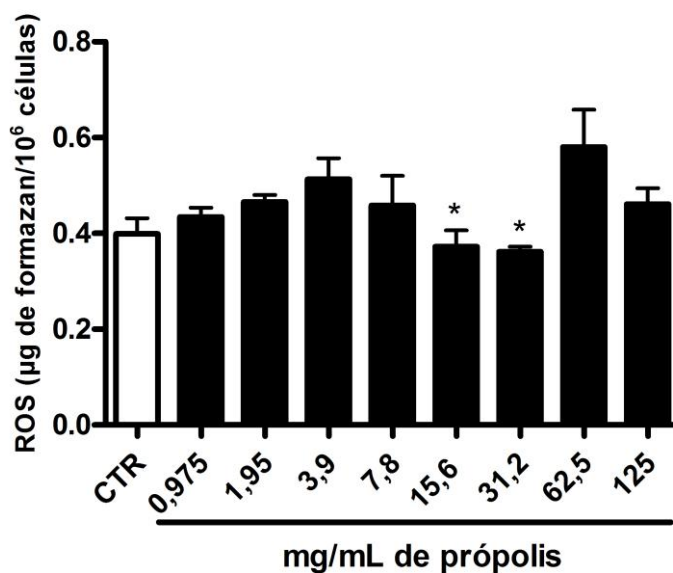


Figura 7 - A influência da própolis sobre a ROS. As células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM com solução de Ham (1:1) com 1% de SFB e tratadas com diversas concentrações de própolis durante 24 horas. * representa o nível de significância de $p < 0,05$.

4.6 A influência da própolis sobre o dano oxidativo

Os níveis de MDA, produto da peroxidação de lipídica, diminuíram de forma concentração-dependente a partir da concentração de 3,2 mg/mL de própolis (Figura 6).

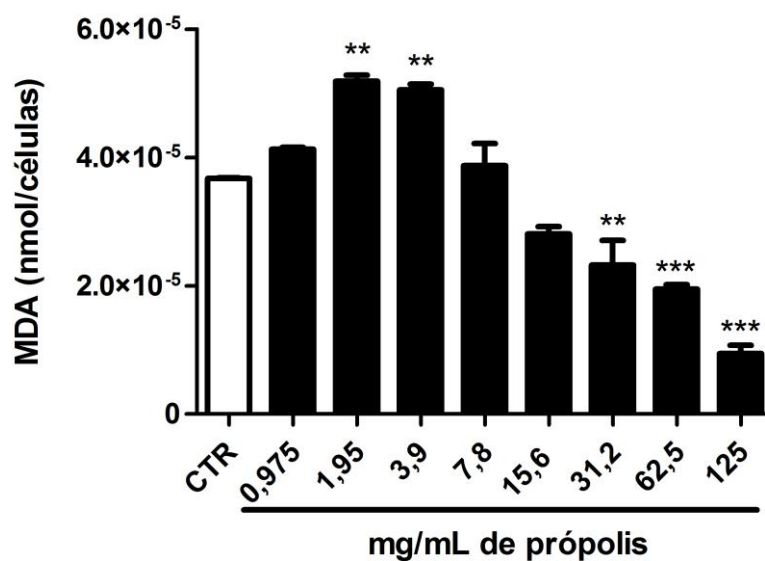


Figura 8 - A prevenção do dano oxidativo pela própolis. As células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM com solução de Ham's (1:1) com 1% de SBF e tratadas com diversas concentrações de própolis durante 24 horas. ** representa o nível de significância de $p < 0,01$ e *** representa o nível de significância estatística de $p < 0,001$.

4.7 A influência da Própolis (P) no parênquima pulmonar e na contagem de células inflamatórias

Os animais C57/BL6 expostos à fumaça de cigarro (grupo CS) (Figura 7b) apresentaram, no parênquima pulmonar, a presença significativa de células inflamatórias quando comparados ao grupo Controle + P (Figura 7a) ou com o grupo CS + P (Figura 7c). A contagem diferencial de células é apresentada na Figura 8. O grupo CS apresentou o aumento do número de macrófagos ($p < 0,01$) quando comparado tanto com o grupo Controle + P ($p < 0,01$) quanto o grupo CS + P ($p < 0,01$). Com relação ao número de neutrófilos, o grupo CS apresentou um aumento quando comparado com Controle + P ($p < 0,001$) e CS + P ($p < 0,001$).

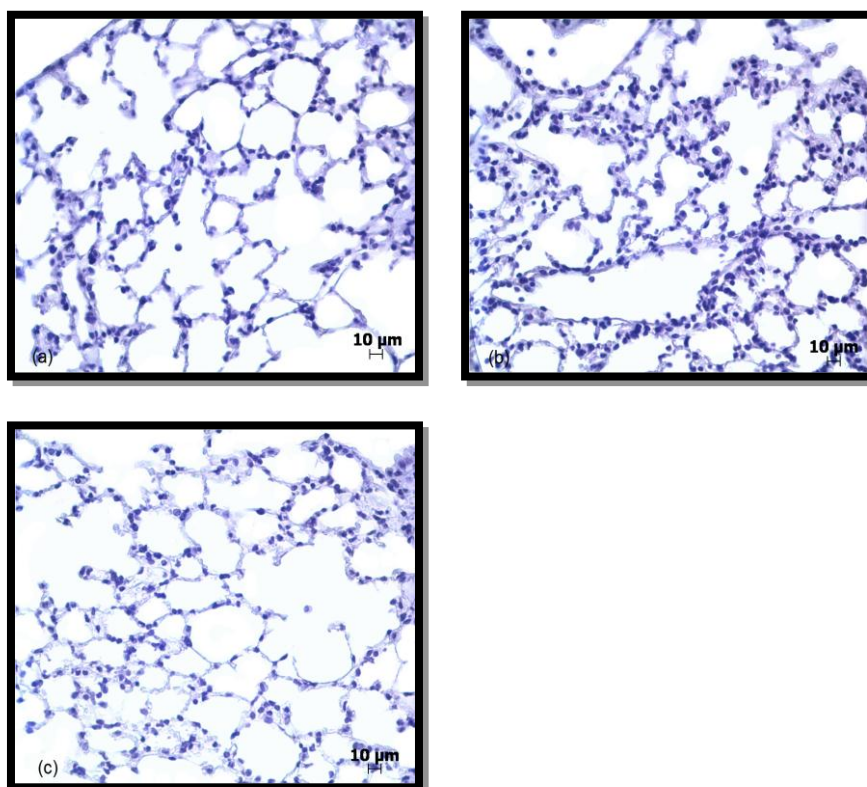


Figura 9 - Análise histológica do tratamento da Própolis no parênquima pulmonar. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. A. Controle + P, B. CS e C. CS + P. Foi utilizada a coloração de Hematoxilina e Eosina. O aumento foi de 200X.

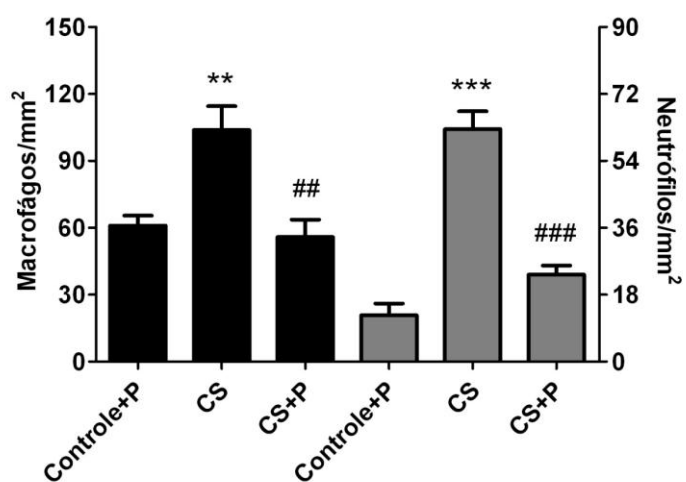


Figura 10 - O tratamento com a Própolis em cinco dias altera a contagem diferencial no tecido. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores estão representados em média±erro padrão da média. * e # representam a diferença significativa entre os grupos Controle + P e CS, respectivamente, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$.

4.8 Efeitos da Própolis sobre a mieloperoxidase (MPO)

Os níveis de MPO no grupo CS aumentaram em relação ao grupo Controle + P ($134 \pm 12,99$ mU/mg proteína total, $p < 0,001$) (Figura 9). O grupo CS + P ($385,1 \pm 27,64$ mU/mg proteína total) apresentou diminuição dos níveis de MPO ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CS ($526,5 \pm 34,72$ mU/mg proteína total). Entretanto, os níveis de MPO no grupo CS + P foram maiores que a do grupo Controle + P ($p < 0,01$).

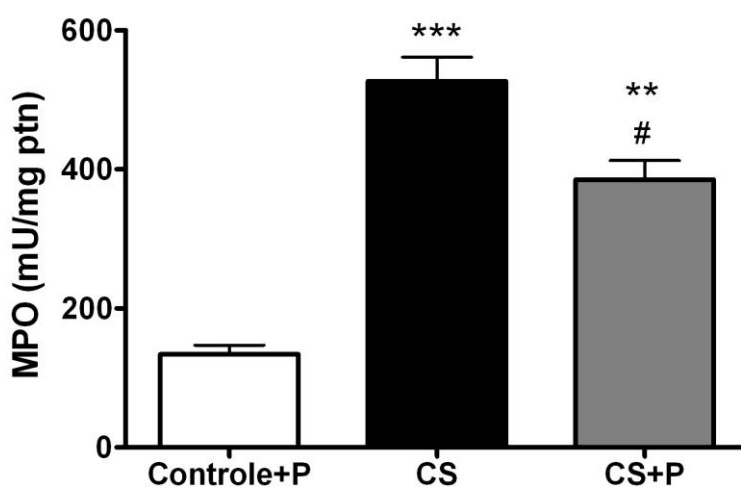


Figura 11 - Os níveis de mieloperoxidase (MPO) diminuíram com o tratamento da Própolis. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores são apresentados em média \pm erro padrão da média. * e # representa a diferença significativa dos grupos Controle + P e CS, respectivamente, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$.

4.9 Efeitos da Própolis sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi maior no grupo CS ($523,5 \pm 29,6$ U/mg proteína total) em relação ao grupo Controle + P ($234,5 \pm 19,78$ U/mg proteína total, $p < 0,001$) (Figura 10). A administração de Própolis resultou no decréscimo da atividade da SOD no grupo CS + P ($246,8 \pm 15,69$ U/mg proteína total) quando comparado com o grupo CS ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle + P e CS + P.

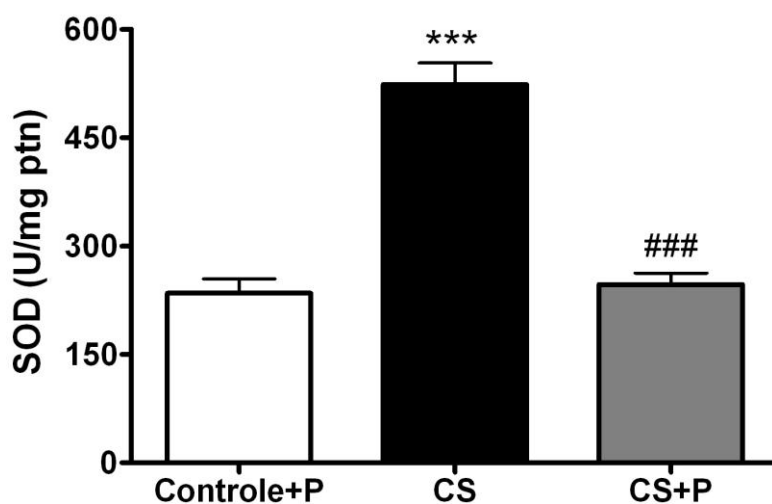


Figura 12 - A atividade da SOD diminuiu com o tratamento da Própolis. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores são apresentados em média \pm erro padrão da média. * e # representam a diferença significativa dos grupos Controle + P e CS, respectivamente, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

4.10 Efeitos da Própolis sobre a atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi analisada no LBA (Figura 11). A atividade dessa enzima foi elevada no grupo CS ($92,68 \pm 6,24$ U/mg proteína total) em relação ao grupo Controle + P ($37,38 \pm 3,39$ U/mg proteína total, $p < 0,001$). CS + P ($59,84 \pm 4,55$ U/mg proteína total) apresentou uma redução na atividade da CAT quando comparada com o grupo CS ($p < 0,05$); entretanto, seus níveis foram maiores que o grupo Controle + P ($p < 0,001$).

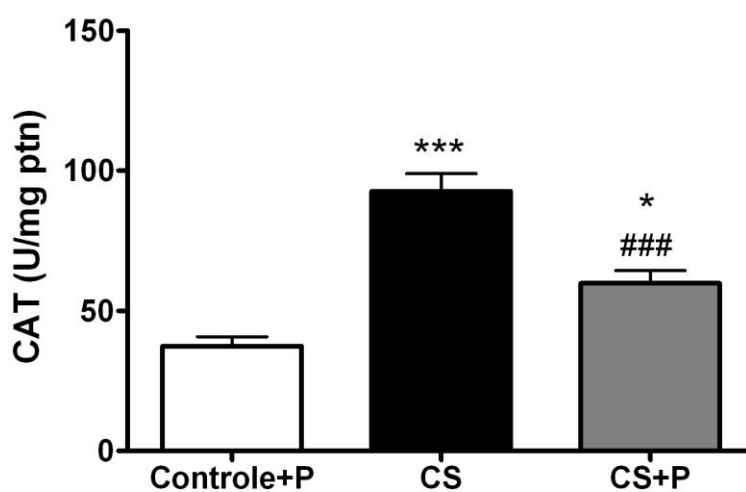


Figura 13 - A atividade da CAT diminuiu com o tratamento da Própolis. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores são apresentados em média±erro padrão da média. * e # representam a diferença significativa dos grupos Controle + P e CS, respectivamente, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

4.11 Efeitos da Própolis sobre a atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx é mostrada na figura 12. O grupo CS ($4,51 \pm 0,31$ ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ proteína total) $\times 10^{-1}$) teve a atividade da GPx aumentada em relação ao grupo Controle + P ($2,23 \pm 0,17$ ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ proteína total) $\times 10^{-1}$, $p < 0,001$). A administração de Própolis reduziu os níveis de atividade da GPx no CS+P ($2,64 \pm 0,19$ ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ proteína total) $\times 10^{-1}$) quando comparado ao grupo CS ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle + P e CS + P.

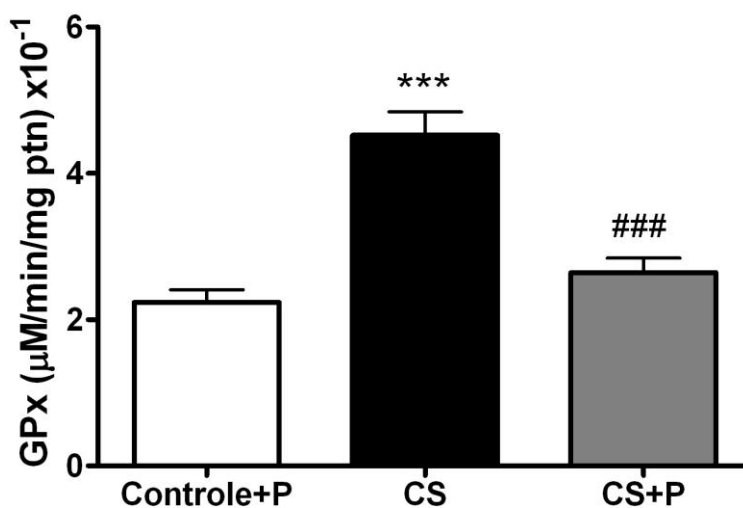


Figura 14 - A atividade da GPx diminuiu com o uso da Própolis. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores são apresentados em média \pm erro padrão da média. * e # representam a diferença significativa dos grupos Controle + P e CS, respectivamente, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

4.12 A ação da Própolis sobre a relação GSH/GSSG

A relação GSH/GSSG foi menor no grupo CS ($0,736\pm 0,07$) quando comparado ao grupo Controle + P ($1,088\pm 0,17$, $p<0,05$). A administração de Própolis resultou na preservação da relação GSH/GSSG no grupo CS+P ($1,258\pm 0,10$) em relação ao grupo CS ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle + P e CS + P (Figura 13).

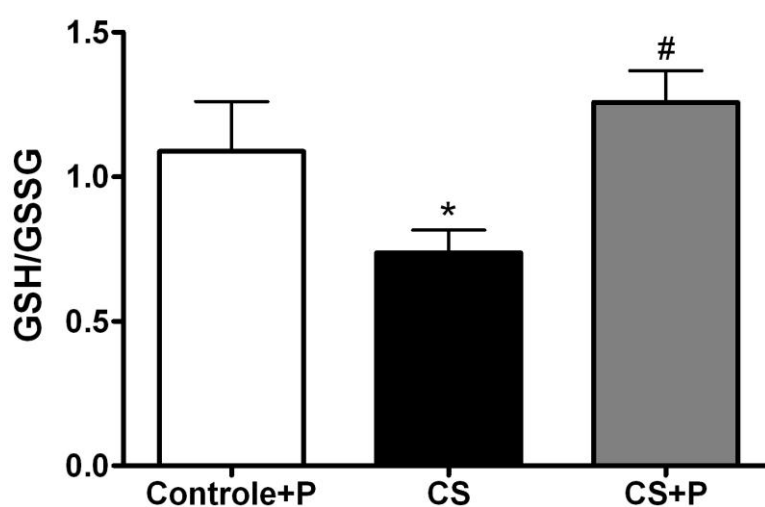


Figura 15 - A relação GSH/GSSG se manteve alto no grupo tratado com a Própolis e exposto à fumaça de cigarro. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores são apresentados em média ± erro padrão. * e # representam a diferença significativa dos grupos Controle + P e CS, respectivamente, * $p<0,05$, # $p<0,05$.

4.13 Efeitos da administração da Própolis sobre os níveis de MDA

Os níveis de malondialdeído (MDA) aumentaram no grupo CS ($0,94 \pm 0,076$ nMol/mg proteína total) quando comparado com o grupo Controle + P ($0,266 \pm 0,05$ nMol/mg proteína total, $p < 0,001$). Os níveis de MDA diminuíram no grupo CS + P ($0,498 \pm 0,06$ nMol/mg proteína total) quando comparado com o grupo Controle + P ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle + P e CS + P (Figura 14).

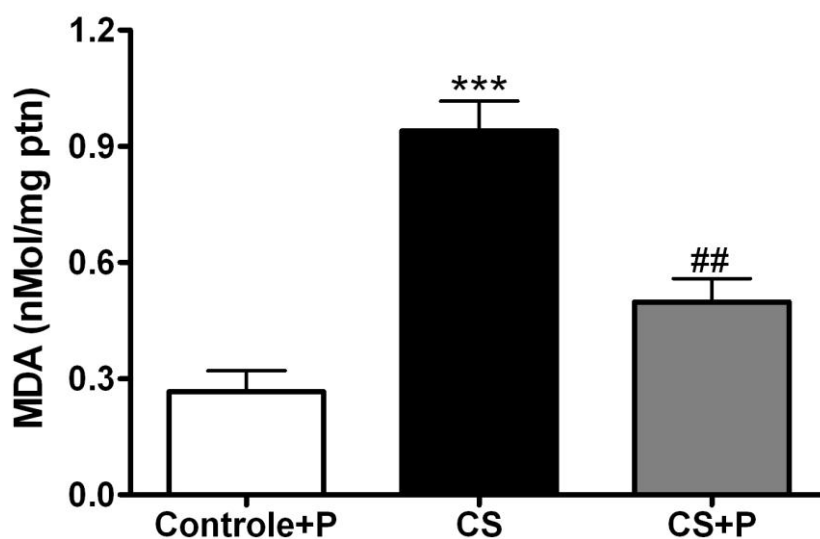


Figura 16 - O dano oxidativo, medido em níveis de malondialdeído (MDA), diminuiu através da ação da Própolis. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores são apresentados em média ± erro padrão da média. * e # representam a diferença significativa dos grupos Controle + P e CS, respectivamente, *** $p < 0,001$, ## $p < 0,01$.

4.14 A ação da Própolis dos níveis de nitrito (NO_2^-)

Os níveis de nitrito aumentaram no grupo CS ($108,7 \pm 7,73 \mu\text{Mol/mg}$ proteína total) quando comparados com o grupo Controle+ P ($50,01 \pm 4,19 \mu\text{Mol/mg}$ proteína total, $p < 0,001$). A administração de Própolis resultou na diminuição dos níveis de nitrito no grupo CS+P ($58,84 \pm 3,42 \mu\text{Mol/mg}$ proteína total) quando comparado com o grupo CS ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os grupos Controle + P e CS + P (Figura 15).

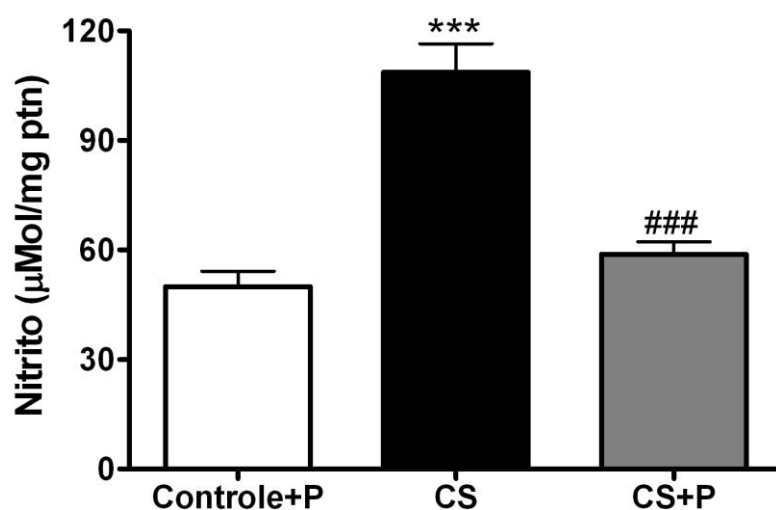


Figura 17 - A diminuição dos níveis de nitrito pela ação da Própolis. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis. Os valores são apresentados em média \pm erro padrão da média. * e # representam a diferença significativa dos grupos Controle + P e CS, respectivamente, *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

4.15 Efeitos da Própolis na expressão proteica do TNF- α

A expressão de TNF- α é apresentada na figura 16. A expressão de TNF- α foi observada somente no grupo CS.

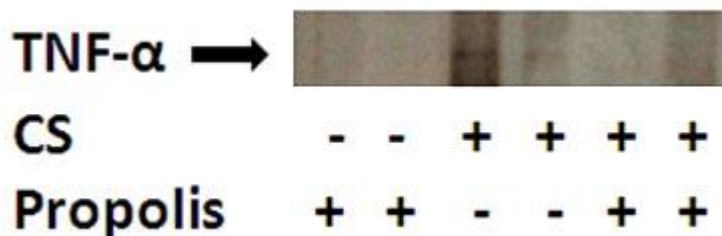


Figura 18 - A expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) diminuiu com a utilização da Própolis. Foram utilizadas duas amostras de homogenado de pulmão de diferentes de cada grupo. Os grupos CS e CS+P foram expostos à fumaça de cigarro durante cinco dias e os grupos Controle+P e CS+P foram tratados com 200 mg/kg/d de própolis.

4 DISCUSSÃO

A própolis é um produto natural que apresenta propriedades anti-inflamatória (Ikeda, Yanagisawa *et al.*, 2011) e antioxidante (Nakajima, Shimazawa *et al.*, 2007). Neste trabalho foi observado de forma geral e detalhada a presença de compostos fenólicos na própolis, na amostra liofilizada e no extrato alcóolico. Os compostos fenólicos que frequentemente são encontrados na própolis brasileira, conferem a maioria das propriedades terapêuticas da própolis (Chang, 2008). A artepilina C e a drupanina e dois compostos hidroxicinâmicos prenilados são conhecidos por possuir ação antioxidante de forma dose-dependente e propriedade anticancerígena (Akao, Maruyama *et al.*, 2003; Inokuchi, Shimazawa *et al.*, 2006).

No presente estudo, foram investigados os efeitos da própolis sobre macrófagos murinos e sobre a inflamação pulmonar aguda causada pela fumaça de cigarro em pulmões de camundongos murinos. Sabe-se que a fumaça de cigarro é a principal causadora do desenvolvimento das DPOC através de uma inflamação constante e progressiva, sendo esta caracterizada por alterações morfológicas no parênquima pulmonar, pelo desequilíbrio redox e pela grande produção de óxido nítrico e de citocinas (Koksel, Ozdulger *et al.*, 2006).

Neste trabalho, foram investigados os principais fatores envolvidos no processo inflamatório e oxidativo causado pela fumaça de cigarro sob as ações benéficas da própolis. Entretanto, o estudo mais apurado sobre os elementos moleculares envolvidos na ação anti-inflamatória e antioxidante da própolis sobre a inflamação pulmonar causada pela fumaça de cigarro precisam ser investigados e analisados para que possa entender como a própolis funciona.

Os tratamentos com a própolis utilizados neste estudo foram dois: o extrato alcóolico e o liofilizado, ambos de origem comercial. A dose utilizada de extrato foi de 200 mg/kg/dia através da via de administração oral. A escolha desta dose foi baseada em estudos que observaram que esta dose possui propriedades antioxidantes na cicatrização de fratura óssea (Guney, Karaman *et al.*, 2011) e anti-inflamatória através da observação dos níveis de citocinas produzidos (Pagliarone, Orsatti *et al.*, 2009). Além disso, alta dose de própolis (300mg/kg) tem apresentado atividade pró-oxidante, aumentando a atividade das enzimas SOD e GPx e de dano oxidativo caracterizado pela peroxidação lipídica (Sobocanec, Sverko *et al.*, 2006).

O uso da forma liofilizada da própolis nos estudos *in vitro* vem da possibilidade de utilização desta forma no meio de cultura, pelo controle das concentrações a serem estudadas e por ser o método utilizado na literatura (Song, Park *et al.*, 2002; Blonska, Bronikowska *et al.*, 2004).

Foi observado que a administração da própolis protegeu o parênquima pulmonar nos grupos tratados por ela. O trabalho de Liu e colaboradores mostrou que a própolis evitou danos no tecido hepático contra os efeitos do econazol impedindo o dano oxidativo em lipídeos e tendo ação *scavenger* sobre os radicais livres (Liu, Lin *et al.*, 2004). Isso pode ser observado neste trabalho através da ação redutora própolis sobre o radical DPPH em diversas concentrações e o aumento da viabilidade celular. Além disso, foi observado que compostos como a artepilina C, o ácido coumárico e a drupanina possuem ação antioxidante contra os efeitos danosos dos raios ultravioleta (Fonseca, Marquele-Oliveira *et al.*, 2011). Foi sugerido que esses compostos agem contra as substâncias oxidantes contidos na fumaça de cigarro, diminuindo o dano oxidativo no tecido e evitando o desenvolvimento do processo inflamatório, que é caracterizado pelo baixo influxo de células inflamatórias no parênquima e possibilitando o aumento da viabilidade das células.

O influxo de células inflamatórias é altamente dependente de certas citocinas como o TNF- α . A administração de própolis resultou na diminuição do influxo de células nos alvéolos. Esta informação sugere que a própolis diminuiu a expressão da citocina TNF- α . Sabe-se que a própolis inibe a produção de citocinas em macrófagos murinos (Bachiega, Orsatti *et al.*, 2012). Essa propriedade da própolis tem sido observada anteriormente em um estudo voltado a camundongos sensibilizados à ovalbumina (OVA) (Sy, Wu *et al.*, 2006). A modulação do TNF- α pela própolis acontece devido à diminuição da ação do NF- κ B pela ação da artepilina C (Paulino, Abreu *et al.*, 2008).

MPO é uma enzima produzida principalmente por neutrófilos e serve como indicador de neutrófila e inflamação (Queiroz-Junior, Pacheco *et al.*, 2009). Portanto, para entender como a própolis atua sobre o metabolismo dos neutrófilos e dos níveis MPO é muito importante. No presente estudo, foi observado que a diminuição dos níveis de MPO nos grupos tratados com a própolis. Entretanto, há poucos estudos envolvendo o uso da própolis e os níveis de MPO, especialmente voltado à ação da fumaça de cigarro. Então, sugere-se que a diminuição do número de neutrófilos no

parênquima pulmonar está relacionada com a ação anti-inflamatória da própolis (Van Der Veen, De Winther *et al.*, 2009).

A atividade das enzimas antioxidantes foi analisada a fim de entender o equilíbrio redox em camundongos expostos à fumaça de cigarro. Neste trabalho, nós observamos que a fumaça de cigarro estimula o aumento das atividades das enzimas antioxidantes: SOD, CAT e GPx, o que está de acordo com estudos anteriores do grupo (Valença, Pimenta *et al.*, 2009). Contudo, a administração de própolis resultou na diminuição significativa na atividade das enzimas avaliadas acima. Poucos estudos têm reportado sobre os efeitos da própolis sobre a atividade da SOD e GPx nos pulmões. O estudo de Nagai e colaboradores descreve a ação “SOD-like” da própolis, que consiste na habilidade de capturar o anion superóxido (Nagai, 2001) como ação da artepilina C e da drupanina sobre os radicais livres, fornecendo uma ação antioxidante (Nakajima, Tsuruma *et al.*, 2009). Sugere-se que a ação *SOD-like* da própolis resultou na diminuição nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ no grupo CS+P. Além disso, foi observado que a própolis diminuiu os níveis de ROS total, sendo que 90% desses radicais detectados correspondem ao ânion superóxido (Choi, Kim *et al.*, 2006). Sugere-se também que o efeito *SOD-like* da própolis influencia nos níveis de H_2O_2 de forma indireta. Isso pode explicar a atenuação dos níveis de atividade da CAT no grupo CS+P. Como a própolis tem propriedades antioxidantes (Newairy, Salama *et al.*, 2009), sugere-se que essas propriedades influenciam na atividade da GPx nos grupos tratados. Essa informação pode ser confirmada pelos altos níveis da relação GSH:GSSG. Esse parâmetro é importante devido a relação redox intrínseca entre a GSH e a GPx (Comhair, Lewis *et al.*, 1999), como também pela sua importância como indicador de estresse oxidativo (Jones, 2002). Neste estudo, foi observado o aumento da relação GSH:GSSG no grupo exposto à fumaça de cigarro e tratado com a própolis. A ação da própolis poderia estar atuando na prevenção da depleção da GSH (Chiao, Carothers *et al.*, 1995).

Segundo a interação com $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico ocorre formação do peroxinitrito ($ONOO^-$) na fumaça de cigarro (Peluffo, Calcerrada *et al.*, 2009). Neste estudo, os grupos tratados com a própolis apresentaram a diminuição dos níveis de óxido nítrico em relação ao exposto à fumaça de cigarro somente. Song e colaboradores tem descrito que a expressão do gene da óxido nítrico sintase foi reduzida após a administração com a própolis (Song, Park *et al.*, 2002). Além disso, estudos tem mostrado que a artepilina C (Paulino, Abreu *et al.*, 2008) e o ácido hidroxicinâmico

(Kim, Min *et al.*, 2012) age sobre a produção de NO em macrófagos e na óxido nítrico sintase induzida, respectivamente. Além disso, sugere-se uma possível ação da própolis sobre o metabolismo do óxido nítrico, que resultou na diminuição nos níveis desse analito no grupo CS+P. Isso pode ser associado com a diminuição da atividade da SOD, descrito anteriormente, levando a redução da produção de peroxinitrito ONOO- (Peluffo, Calcerrada *et al.*, 2009).

O malondialdeído é um produto da peroxidação lipídica e serve como marcador de dano oxidativo em vários tipos de tecido (Marnett, 2000). O nosso grupo tem apresentado o aumento desse marcador em estudos de exposição à fumaça de cigarro em curto prazo, ou seja, a fumaça de cigarro provoca dano oxidativo no tecido pulmonar (Valenca, Pimenta *et al.*, 2009; Rueff-Barroso, Trajano *et al.*, 2010). Esse estudo confirma esta observação. Além disso, a administração de P diminui os níveis de MDA no homogenado pulmonar. E há trabalhos que mostram que artemisina C (Kimoto, Koya *et al.*, 2000) e o ácido coumárico (Larrosa, Lodovici *et al.*, 2008) previne a peroxidação lipídica em camundongos. O resultado obtido nos sugere que a própolis possui um efeito antioxidante contra a fumaça de cigarro exposta aos pulmões devido a sua ação *scavenger* contra os radicais lipídicos (Liu, Lin *et al.*, 2004; Jasprica, Mornar *et al.*, 2007).

5 CONCLUSÃO

A própolis é um produto natural composto de várias substâncias, dentre elas, os polifenóis como o ácido hidroxicinâmico, ácido coumárico, a drupanina e a artepilina C identificados. Além disso, foram observados:

- Estudo *in vitro*: o aumento da viabilidade de células RAW 264.7, o alto poder antioxidante da própolis, a diminuição de espécies reativas de oxigênio e a diminuição do dano oxidativo em lipídeos de membrana;
- Estudo *in vivo*: diminuição do influxo de células inflamatórias e do estresse oxidativo no parênquima pulmonar; o restabelecimento do equilíbrio redox e a diminuição do dano oxidativo em lipídeos de membrana.

A partir desse contexto conclui-se que a própolis possui ação anti-inflamatória antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, há a necessidade de maiores estudos sobre os mecanismos celular e moleculares envolvidos na ação antioxidante da própolis sobre a inflamação pulmonar causada pela fumaça de cigarro.

REFERÊNCIAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol, v.105, p.121-6. 1984.
- Ahn, M. R., S. Kumazawa, *et al.* Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. J Agric Food Chem, v.52, n.24, Dec 1, p.7286-92. 2004.
- Akao, Y., H. Maruyama, *et al.* Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. Biol Pharm Bull, v.26, n.7, Jul, p.1057-9. 2003.
- Bachiega, T. F., C. L. Orsatti, *et al.* The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages. Phytother Res, Jan 25. 2012.
- Bannister, J. V. e L. Calabrese. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem Anal, v.32, p.279-312. 1987.
- Barbera, J. A., V. I. Peinado, *et al.* Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.4, Aug 15, p.709-13. 2001.
- Bargagli, E., C. Olivieri, *et al.* Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. Respir Med, v.103, n.9, Sep, p.1245-56. 2009.
- Blonska, M., J. Bronikowska, *et al.* Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. J Ethnopharmacol, v.91, n.1, Mar, p.25-30. 2004.
- Boyanova, L., S. Derejian, *et al.* Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. J Med Microbiol, v.52, n.Pt 5, May, p.417-9. 2003.
- Bracke, K. R., I. D'hulst A, *et al.* Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. J Immunol, v.177, n.7, Oct 1, p.4350-9. 2006.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Brasil, M. D. S., Instituto Nacional Do Câncer José Alencar Gomes Da Silva. A situação do tagagismo no Brasil: dados dos inquéritos do Sistema Intercional de Vigilância, da Organização Mundial da Saúde, realizados no Brasil, entre 2002 e 2009. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2011.

- Carnevali, S., S. Petruzzelli, *et al.* Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.284, n.6, Jun, p.L955-63. 2003.
- Castro, P., H. Nasser, *et al.* Aspirin and indomethacin reduce lung inflammation of mice exposed to cigarette smoke. Biochem Pharmacol, v.77, n.6, Mar 15, p.1029-39. 2009.
- Chang, R., Piló-Veloso, D., Morais, S. A. L., Nascimento E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.18, n.4, p.549-556. 2008.
- Chen, M. F., P. C. Keng, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester decreases acute pneumonitis after irradiation in vitro and in vivo. BMC Cancer, v.5, p.158. 2005.
- Chiao, C., A. M. Carothers, *et al.* Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. Cancer Res, v.55, n.16, Aug 15, p.3576-83. 1995.
- Choi, H. S., J. W. Kim, *et al.* A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. J Immunoassay Immunochem, v.27, n.1, p.31-44. 2006.
- Comhair, S. A., M. J. Lewis, *et al.* Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals with chronic beryllium disease. Am J Respir Crit Care Med, v.159, n.6, Jun, p.1824-9. 1999.
- Culpitt, S. V., D. F. Rogers, *et al.* Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. Thorax, v.58, n.11, Nov, p.942-6. 2003.
- Dohan, F. C. e E. W. Taylor. Air pollution and respiratory disease. A preliminary report. Am J Med Sci, v.240, Sep, p.337-9. 1960.
- Doll, R. e A. B. Hill. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. Br Med J, v.2, n.4682, Sep 30, p.739-48. 1950.
- Draper, H. H., E. J. Squires, *et al.* A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic Biol Med, v.15, n.4, Oct, p.353-63. 1993.
- Dweik, R. A. The lung in the balance: arginine, methylated arginines, and nitric oxide. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.292, n.1, Jan, p.L15-7. 2007.
- Ferrer, E., V. I. Peinado, *et al.* Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig. Respir Res, v.10, p.76. 2009.
- Fidan, H., O. Sahin, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester reduces mortality and sepsis-induced lung injury in rats. Crit Care Med, v.35, n.12, Dec, p.2822-9. 2007.

Flohe, L. e W. A. Gunzler. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, v.105, p.114-21. 1984.

Fonseca, Y. M., F. Marquete-Oliveira, *et al.* Evaluation of the Potential of Brazilian Propolis against UV-Induced Oxidative Stress. Evid Based Complement Alternat Med, v.2011. 2011.

Fuliang, H. U., H. R. Hepburn, *et al.* Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. Pharmacol Res, v.51, n.2, Feb, p.147-52. 2005.

Ghosh, S. e M. S. Hayden. New regulators of NF-kappaB in inflammation. Nat Rev Immunol, v.8, n.11, Nov, p.837-48. 2008.

Green, L. C., D. A. Wagner, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem, v.126, n.1, Oct, p.131-8. 1982.

Guney, A., I. Karaman, *et al.* Effects of Propolis on Fracture Healing: An Experimental Study. Phytother Res, Mar 21. 2011.

Hu, F., H. R. Hepburn, *et al.* Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. J Ethnopharmacol. 100: 276-83 p. 2005.

Huleihel, M. e V. Isanu. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. Isr Med Assoc J, v.4, n.11 Suppl, Nov, p.923-7. 2002.

Ikeda, R., M. Yanagisawa, *et al.* Brazilian propolis-derived components inhibit TNF-alpha-mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. Biochim Biophys Acta, v.1810, n.7, Jul, p.695-703. 2011.

Inokuchi, Y., M. Shimazawa, *et al.* Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. Evid Based Complement Alternat Med, v.3, n.1, Mar, p.71-7. 2006.

Janaszewska, A. e G. Bartosz. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest, v.62, n.3, p.231-6. 2002.

Jasprica, I., A. Mornar, *et al.* In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. J Ethnopharmacol, v.110, n.3, Apr 4, p.548-54. 2007.

Jones, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Methods Enzymol, v.348, p.93-112. 2002.

Jung, W. K., D. Y. Lee, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine model of ovalbumin-induced asthma. Life Sci, v.82, n.13-14, Mar 26, p.797-805. 2008.

Kamata, H., S. Honda, *et al.* Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell, v.120, n.5, Mar 11, p.649-61. 2005.

Khayyal, M. T., M. A. El-Ghazaly, *et al.* A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. Fundam Clin Pharmacol, v.17, n.1, Feb, p.93-102. 2003.

Kim, E. O., K. J. Min, *et al.* Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. Food Chem Toxicol, v.50, n.5, May, p.1309-16. 2012.

Kimoto, T., S. Koya, *et al.* Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. Pathol Int, v.50, n.9, Sep, p.679-89. 2000.

Koksel, O., A. Ozdulger, *et al.* Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. Pulm Pharmacol Ther, v.19, n.2, p.90-5. 2006.

Kuebler, W. M., C. Abels, *et al.* Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. Int J Microcirc Clin Exp, v.16, n.2, Mar-Apr, p.89-97. 1996.

Lanzetti, M., F. S. Bezerra, *et al.* Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. Nutrition, v.24, n.4, Apr, p.375-81. 2008.

Lanzetti, M., A. A. Lopes, *et al.* Mate tea ameliorates emphysema in cigarette smoke-exposed mice. Exp Lung Res, v.37, n.4, May, p.246-57. 2011.

Lappalainen, U., J. A. Whitsett, *et al.* Interleukin-1 β causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. Am J Respir Cell Mol Biol, v.32, n.4, Apr, p.311-8. 2005.

Larrosa, M., M. Lodovici, *et al.* Hydrocaffeic and p-coumaric acids, natural phenolic compounds, inhibit UV-B damage in WKD human conjunctival cells in vitro and rabbit eye in vivo. Free Radic Res, v.42, n.10, Oct, p.903-10. 2008.

Lee, J. H., D. S. Lee, *et al.* Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs. Am J Respir Crit Care Med, v.172, n.8, Oct 15, p.987-93. 2005.

Liao, J. P., C. H. Chi, *et al.* Effects of N-acetylcysteine on Clara cells in rats with cigarette smoke exposure. Chin Med J (Engl), v.123, n.4, Feb, p.412-7. 2010.

Liu, C. F., C. H. Lin, *et al.* Antioxidative natural product protect against econazole-induced liver injuries. Toxicology, v.196, n.1-2, Mar 1, p.87-93. 2004.

Mak, J. C. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. Int J Tuberc Lung Dis, v.12, n.4, Apr, p.368-74. 2008.

Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis, v.21, n.3, Mar, p.361-70. 2000.

Masri, F. A., S. A. Comhair, *et al.* Abnormalities in nitric oxide and its derivatives in lung cancer. Am J Respir Crit Care Med, v.172, n.5, Sep 1, p.597-605. 2005.

Mclennan, S. V., J. Bonner, *et al.* The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. Wound Repair Regen, v.16, n.5, Sep-Oct, p.706-13. 2008.

Mitchell, R. S., R. E. Stanford, *et al.* The morphologic features of the bronchi, bronchioles, and alveoli in chronic airway obstruction: a clinicopathologic study. Am Rev Respir Dis, v.114, n.1, Jul, p.137-45. 1976.

Nagai, T., Sakaia, M., Inouec, R., Inouec, H. And Suzuki, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chemistry, v.75, n.2, p.237-240. 2001.

Nakajima, Y., M. Shimazawa, *et al.* Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. Life Sci, v.80, n.4, Jan 2, p.370-7. 2007.

Nakajima, Y., K. Tsuruma, *et al.* Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. BMC Complement Altern Med, v.9, p.4. 2009.

Newairy, A. S., A. F. Salama, *et al.* Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. Food Chem Toxicol, v.47, n.6, Jun, p.1093-8. 2009.

O'donnell, R., D. Breen, *et al.* Inflammatory cells in the airways in COPD. Thorax, v.61, n.5, May, p.448-54. 2006.

Oliveira, A. C., C. S. Shinobu, *et al.* Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.101, n.5, Aug, p.493-7. 2006.

Orsollic, N., A. H. Knezevic, *et al.* Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. J Ethnopharmacol, v.94, n.2-3, Oct, p.307-15. 2004.

Pagliarone, A. C., C. L. Orsatti, *et al.* Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice. Int Immunopharmacol, v.9, n.11, Oct, p.1352-6. 2009.

Paulino, N., S. R. Abreu, *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. Eur J Pharmacol, v.587, n.1-3, Jun 10, p.296-301. 2008.

Peluffo, G., P. Calcerrada, *et al.* Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.296, n.6, Jun, p.H1781-92. 2009.

Pires, K. M., M. Lanzetti, *et al.* Oxidative damage in alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract and participation of nitric oxide in redox balance. Toxicol In Vitro, v.26, n.6, Sep, p.791-8. 2012.

Pires, K. M., S. S. Valenca, *et al.* Grape skin extract reduced pulmonary oxidative response in mice exposed to cigarette smoke. Med Sci Monit, v.17, n.8, Aug, p.BR187-195. 2011.

Queiroz-Junior, C. M., C. M. Pacheco, *et al.* Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. Mediators Inflamm, v.2009, p.760837. 2009.

Rahman, I. Antioxidant therapies in COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, v.1, n.1, p.15-29. 2006.

Rahman, I., A. Kode, *et al.* Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. Nat Protoc, v.1, n.6, p.3159-65. 2006.

Rahman, I. e W. Macnee. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. Am J Physiol, v.277, n.6 Pt 1, Dec, p.L1067-88. 1999.

Rangasamy, T., V. Misra, *et al.* Cigarette smoke-induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.296, n.6, Jun, p.L888-900. 2009.

Reddy, S. P. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. Curr Mol Med, v.8, n.5, Aug, p.376-83. 2008.

Reichner, J. S., J. A. Mulligan, *et al.* Electron transport chain activity in normal and activated rat macrophages. J Surg Res, v.59, n.6, Dec, p.636-43. 1995.

Roethig, H. J., S. Munjal, *et al.* Population estimates for biomarkers of exposure to cigarette smoke in adult U.S. cigarette smokers. Nicotine Tob Res, v.11, n.10, Oct, p.1216-25. 2009.

Roth, M. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. Int J Tuberc Lung Dis, v.12, n.4, Apr, p.375-80. 2008.

Rueff-Barroso, C. R., E. T. Trajano, *et al.* Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. Med Sci Monit, v.16, n.7, p.BR218-26. 2010.

Russo, A., N. Troncoso, *et al.* Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. Life Sci, v.78, n.13, Feb 23, p.1401-6. 2006.

Sa-Nunes, A., L. H. Faccioli, *et al.* Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. J Ethnopharmacol, v.87, n.1, Jul, p.93-7. 2003.

Schmekel, B., S. E. Karlsson, *et al.* Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity. Inflammation, v.14, n.4, Aug, p.447-54. 1990.

Sforcin, J. M. Propolis and the immune system: a review. J Ethnopharmacol, v.113, n.1, Aug 15, p.1-14. 2007.

Shimizu, K., H. Ashida, *et al.* Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. Arch Biochem Biophys, v.424, n.2, Apr 15, p.181-8. 2004.

Silva Bezerra, F., S. S. Valenca, *et al.* Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. Nutrition, v.22, n.11-12, Nov-Dec, p.1192-201. 2006.

Singleton, V. L. e J. A. Rossi. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Society for Enology and Viticulture, v.16, n.3, p.144-158. 1965.

Sobocanec, S., V. Sverko, *et al.* Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. J Agric Food Chem, v.54, n.21, Oct 18, p.8018-26. 2006.

Song, Y. S., E. H. Park, *et al.* Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. J Ethnopharmacol, v.80, n.2-3, May, p.155-61. 2002.

Speina, E., K. D. Arczewska, *et al.* Contribution of hMTH1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients. J Natl Cancer Inst, v.97, n.5, Mar 2, p.384-95. 2005.

Sy, L. B., Y. L. Wu, *et al.* Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. Int Immunopharmacol, v.6, n.7, Jul, p.1053-60. 2006.

Takanami, Y., T. Moriyama, *et al.* Analysis of hydrogen peroxide in an aqueous extract of cigarette smoke and effect of pH on the yield. Biosci Biotechnol Biochem, v.73, n.10, Oct, p.2222-5. 2009.

Tan-No, K., T. Nakajima, *et al.* Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. Biol Pharm Bull, v.29, n.1, Jan, p.96-9. 2006.

Umstead, T. M., W. M. Freeman, *et al.* Age-related changes in the expression and oxidation of bronchoalveolar lavage proteins in the rat. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.296, n.1, Jan, p.L14-29. 2009.

Valenca, S. S., F. S. Bezerra, *et al.* Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. J Nutr Biochem, v.19, n.9, Sep, p.604-11. 2008.

Valenca, S. S., P. Castro, *et al.* Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. Int J Exp Pathol, v.87, n.5, Oct, p.373-81. 2006.

Valenca, S. S., K. Da Hora, *et al.* Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. Toxicol Pathol, v.32, n.3, May-Jun, p.351-6. 2004.

Valenca, S. S., W. A. Pimenta, *et al.* Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. Nitric Oxide, v.20, n.3, May, p.175-81. 2009.

Valenca, S. S., C. R. Rueff-Barroso, *et al.* L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice. Pulm Pharmacol Ther, v.24, n.5, Oct, p.587-94. 2011.

Valenca, S. S., F. Silva Bezerra, *et al.* Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. Environ Res, v.108, n.2, Oct, p.199-204. 2008.

Valko, M., D. Leibfritz, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, v.39, n.1, p.44-84. 2007.

Van Der Veen, B. S., M. P. De Winther, *et al.* Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. Antioxid Redox Signal, v.11, n.11, Nov, p.2899-937. 2009.

Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, *et al.* Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. J Food Sci, v.73, n.9, Nov, p.R117-24. 2008.

Wang, L. C., Y. L. Lin, *et al.* The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. BMC Immunol, v.10, p.39. 2009.

Who. Global status report on noncommunicable diseases. World Health Organization. 2011.

Wijnhoven, H. J., L. M. Heunks, *et al.* Oxidative and nitrosative stress in the diaphragm of patients with COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, v.1, n.2, p.173-9. 2006.

Xia, Y. e J. L. Zweier. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.13, Jun 24, p.6954-8. 1997.

Yates, D. H., H. Breen, *et al.* Passive smoke inhalation decreases exhaled nitric oxide in normal subjects. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.6, Sep 15, p.1043-6. 2001.