

Comunicação

[Communication]

Composto homeopático reduz a liberação de ânion superóxido pelas células mononucleares de ema (*Rhea americana*)

[Homeopathic compound reduces the release of superoxide anion by mononuclear cells of rhea (*Rhea americana*)]

W.R. Bertoldo¹, J.L. França^{1,2}, L.T.O. Fernandes^{3*}, A.C. França-Botelho¹

¹Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário do Planalto de Araxá - Araxá, MG

²Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, SP

³Centro de Desenvolvimento Ambiental da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) - Araxá, MG

A ema (*Rhea americana*), pertencente ao grupo de aves conhecido como ratitas (Huchzermeyer, 2000) é típica da fauna brasileira e sul-americana. Assim como outras ratitas, como o avestruz e o emu, a ema tem sido explorada comercialmente. Os principais produtos da indústria da ema, atualmente, são a carne, o couro e as plumas (Toledo e Tavares, 2003).

Muitas espécies animais sofrem estresse causado pelos distúrbios provocados pelos seres humanos ou pela alteração de seu hábitat, provocando diminuição na taxa reprodutiva, alterações imunológicas e distúrbios comportamentais (Boonstra, 2004). Os animais respondem ao estresse com uma série de respostas endócrinas. Dentre elas destaca-se o aumento nas concentrações de cortisol (Creel, 2001). Com isso, há um desequilíbrio nos processos catabólicos e anabólicos, que, por longo período, afetam negativamente a sobrevivência, a reprodução e a resistência às doenças (Boonstra, 2004; Leche *et al.*, 2009).

São escassos os trabalhos envolvendo o metabolismo oxidativo de aves (Rodríguez *et al.*, 2007; Trevelin *et al.*, 2009) e ainda não há descrição de possíveis moduladores dessa resposta. Diante disso e considerando seu potencial econômico, propôs-se testar a ação do composto homeopático *Fator Estresse Avestruz* (Arenales – Fauna e Flora) indicado para redução do estresse de aves ratitas na liberação de ânion

superóxido pelas células do sangue periférico de emas.

O estudo foi realizado no período de setembro de 2007 a maio de 2008, no Criadouro Conservacionista do Centro de Desenvolvimento Ambiental (CDA) da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), situado em Araxá, MG.

O experimento foi realizado com 16 filhotes, com idade média de sete meses e meio de vida, provenientes tanto de incubação natural quanto de incubação artificial. Logo após o nascimento, os filhotes foram levados para a maternidade do criadouro, onde foram abrigados em recintos cobertos e com campânulas. Pela manhã os filhotes foram levados para o piquete, para o banho de sol e a manutenção dos recintos, onde permaneciam até o fim da tarde, exceto em dias de chuva. O acesso à água foi irrestrito, e a alimentação era composta de verduras de folhas, legumes, frutas e ração inicial (L'atruche – Socil), oferecida duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde.

Os animais foram distribuídos em dois grupos de oito animais. O grupo experimental recebeu tratamento homeopático com o *Fator Estresse Avestruz*, composto por *Aconitum napellus* CH12, *Chamomilla* CH12, *Bixa orellana* e sacarose, administrado junto à alimentação. Foram utilizadas duas doses, sob orientação do

Recebido em 4 de maio de 2011

Aceito em 1 de setembro de 2011

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: alinecfb@terra.com.br

laboratório e da bula, de 3g por indivíduo, duas vezes ao dia, do nascimento aos 60 dias de idade, e de 5g por indivíduo, duas vezes ao dia, a partir dos 60 dias de idade, até os filhotes completarem oito meses de vida.

Foram coletadas 16 amostras de 5mL de sangue venoso pela veia jugular. As amostras, coletadas no período da manhã e colocadas em tubos heparinizados, foram encaminhadas ao laboratório. A separação de fagócitos foi feita pelo método de centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll-Paque (densidade: 1.077g/mL – Pharmacia), por 40 minutos, 160 x g sob temperatura ambiente.

Após a centrifugação do sangue, formou-se uma camada com formato de anel, com células mononucleares, sendo este retirado e reservado. A outra porção do sangue foi submetida à sedimentação por Dextran (10g/1 – Sigma), por um período de duas horas, a 37°C, para a separação das células polimorfonucleares (França, 1997).

A produção de ânion superóxido pelos fagócitos do sangue periférico foi determinada utilizando-se o cromógeno ferricitocromo C, segundo o método de Pick e Mizel (1981). Em presença de superóxido, o ferricitocromo C sofre oxidação, passando a ferrocitocromo C, sendo esta mudança colorimétrica detectável em espectrofotômetro com filtro de 630nm. As suspensões foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços, com um volume de 100µL por poço, acrescidas 0,5mL de ferricitocromo C (SIGMA) nas amostras. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de placas (Elisa Plate Reader p 2000 - Robonik) para placa com filtro 630nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada por meio da seguinte relação: $Concentração\ O_2^- (nmol) = (DO \times 100)/6,3$. Com auxílio do programa GraphPad InStat (3.0

for Windows), foi aplicado o teste t para comparação entre os grupos.

A Fig. 1 mostra a concentração de superóxidos liberados por células MN e PMN do sangue das emas em presença e ausência do *Fator Estresse Avestruz*. Nos MN obtiveram-se 4,9 e 8,2 para os grupos teste e controle, respectivamente, e houve diferença significativa entre os grupos. Entretanto, para células PMN, as concentrações foram de 4,6 e 5,4 para os grupos teste e controle, respectivamente, e não houve diferença entre eles. A redução observada para células MN indica que o composto, ao reduzir os níveis de estresse do animal, também provoca redução do estresse oxidativo em nível celular. Isso pode ser benéfico, pois a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos ao DNA e morte celular (Anderson, 1996).

Nas aves, os heterófilos são leucócitos PMN equivalentes aos neutrófilos nos mamíferos e são essenciais para o funcionamento do sistema imunológico inato. Sob estímulo, expressam receptores de membrana responsáveis pela aderência e migração pelo endotélio vascular, dirigindo-se por quimiotaxia ao sítio de infecção. Após fagocitose, há a morte do agente infeccioso por meio de enzimas líticas e agentes oxidantes (Farnell *et al.*, 2003). Então, se o composto avaliado neste estudo provocasse redução de superóxido nos PMN das emas, que já se apresentava em concentrações baixas, poderia comprometer a defesa em casos de infecções.

Neste estudo, pôde-se observar redução de superóxido pelas células MN em presença de *Fator Estresse Avestruz*, indicando influência positiva do produto em relação ao estresse oxidativo. Além disso, surgiram perspectivas para investigações futuras como avaliação de outros intermediários reativos do oxigênio e enzimas antioxidantes.

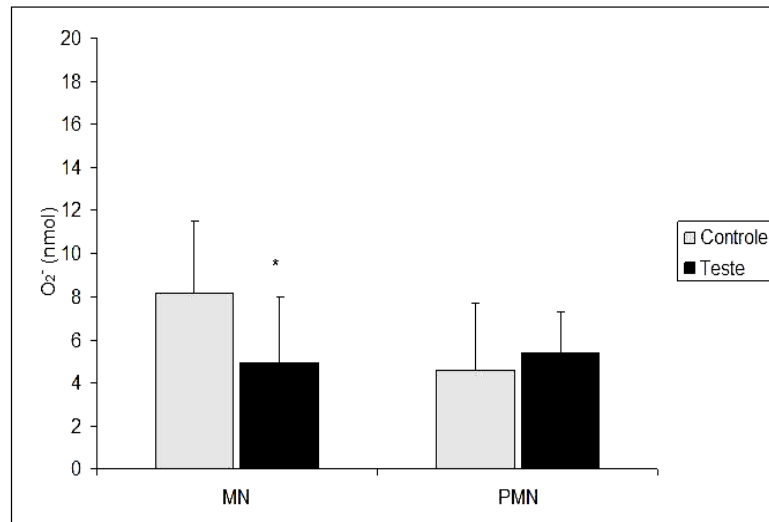


Figura 1. Concentração de ânion superóxido liberado por células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) do sangue de ema em presença (teste) e ausência (controle) de *Fator Estresse Avestruz*. *indica diferença estatística significativa (P<0.05).

Palavras-chave: ema, estresse, superóxido, leucócitos

ABSTRACT

The action of the "Stress Factor Ostrich (Arenales - Fauna and Flora)" was tested in the release of superoxide anion by cells in the peripheral blood of rhea (*Rhea americana*). Sixteen samples of 0.5mL of venous blood were collected through the jugular vein in the morning and placed in heparinized tubes. The leukocytes were separated into polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN). The production of superoxide anion by phagocytes of peripheral blood was determined using the chromogen ferricytochrome C. There was a reduction of superoxide by MN cells in the presence of "Stress Factor Ostrich" indicating a positive influence of product against oxidative stress. Furthermore, future researches, such as the evaluation of other reactive oxygen intermediates and antioxidant enzymes, researches.

Keywords: *Rhea americana*, stress, superoxide, leukocytes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Res.*, v.350, p.103-108, 1996.

BOONSTRA, R. Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals. *Integr. Comp. Biol.*, v.44, p.95-108, 2004.

CREEL, S. Social dominance and stress hormones. *Ecol. Evol.*, v.16, p.491-497, 2001.

FARNELL, M.B.; HE, H.; KOGUT, M.H. Differential activation of signal transduction pathways mediating oxidative burst by chicken heterophils in response to stimulation with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Inflammation*, v.27, p.225-231, 2003.

FRANÇA, E L. *Ativação de fagócitos do sangue periférico pelo Paracoccidioides brasiliensis e pela Escherichia coli enteropatogênica: produção do ânion superóxido e modulação pelo hormônio melatonina*. 1997. 148f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP.

HUCHZERMAYER, F.W. *Doenças de aves e outras ratitas*. Jaboticabal, SP: Funep, 2000. 391p.

LÈCHE, A.; BUSO, J.M.; HANSEN, C. *et al.* Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.162, p.188-191, 2009.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, v.46, p.211-226, 1981.

RODRÍGUEZ, A.B.; ORTEGA, E.; LEA, R.W. *et al.* Melatonin and the phagocytic process of heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Mol. Cellular Biochem.*, v.168, p.185-190, 1997.

TOLEDO, L.R.; TAVARES, D. Emas: opção nativa. *Globo Rural*, v.18, p.28-37, 2003.

TREVELIN, S.C. Metabolismo oxidativo de heterófilos de aves jovens. *Cienc. Rural*, v.39, p.2099-2104, 2009.