



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AÇÃO DA PRÓPOLIS SOBRE A MATURAÇÃO E FUNÇÃO DE  
CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

BRUNO JOSÉ CONTI

ORIENTADOR: PROF. ADJUNTO JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção  
do título de Doutor junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,  
Área de concentração: Biomoléculas:  
Estrutura e Função

*Orientador: Prof. Adjunto José Mauricio Sforcin*

BOTUCATU – SP  
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Conti, Bruno José.

Ação da própolis sobre a maturação e função de células dendríticas humanas / Bruno José Conti. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Maurício Sforcin

Capes: 21100004

1. Própole - Uso terapêutico. 2. Citocinas. 3. Células dendríticas. 4. Resposta imune.

Palavras-chave: Células dendríticas; Citocinas; Produtos apícolas; Produtos naturais; Própolis.

*Aos meus pais, Luiza e Célio pelo amor incondicional e pela paciência.*

*Por me oferecerem a oportunidade de estudar, acreditando e  
respeitando minhas decisões e nunca deixando que as  
dificuldades acabassem com os meus sonhos*

*O meu eterno e singelo*

*Muito Obrigado.*

*“Tudo conquistado nesta trajetória, por meio de esforços e muita dedicação, só foi possível por que algumas pessoas fizeram parte deste momento da minha história de vida. Sendo assim, a todas elas agradeço pela realização deste trabalho”.*

*Agradeço inicialmente, aos meus pais Luiza e Célio por sempre apostarem e terem me proporcionado o acesso à uma das maiores riquezas que existe: a educação. Vivenciando todos os momentos com afeto e dedicação para que eu trilhasse este caminho sem medo e pudesse realizar os meus sonhos, mesmo que muitas das vezes tivessem de renunciar os seus;*

*Às minhas irmãs, Andréia e Amanda, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis, e apoio em minhas escolhas e decisões;*

*Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. José Maurício Sforcin, os mais sinceros agradecimentos. Sua confiança e orientação foi capaz de me fazer trilhar para um crescimento profissional ético e concreto. Orientador é uma palavra ideal para defini-lo: é sob sua tutela que guio meus passos. Muito obrigado!;*

*À Dra. Marjorie de Assis Golim e ao Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho, pela colaboração e seus conhecimentos repassados durante o desenvolvimento deste trabalho, além do grande apoio e gentil presteza em nos ajudar;*

*À minha amiga e companheira Karina Basso Santiago, pela amizade, paciência e competência com que me acompanhou durante toda a realização deste trabalho;*

*Aos colegas do laboratório de Imunomodulação por Produtos Naturais, assim como outros laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos momentos especiais compartilhados, pela relação saudável que mantemos durante o desenvolvimento do meu doutorado;*

*Aos docentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IBB, pela agradável convivência, bem como pela amizade e atmosfera positiva, que nos possibilita um rendimento maior em todos os planos;*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de auxílios à pesquisa (2012/14176-0) e bolsa de estudo (2012/13996), que viabilizaram a realização do projeto desenvolvido;*

*Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram e me ajudaram na concretização deste trabalho.*



*“Os pescadores sabem que o mar é perigoso e a tormenta terrível,  
mas este conhecimento não os impede de lançar-se ao mar”.*

*Vincent Van Gogh*

## Lista de Abreviaturas e Siglas

**ATCC:** American Type Culture Collection

**APCs:** Antigen-presenting Cells

**BHI:** Brain-Heart Infusion

**CD:** Cluster of Differentiation

**CFU:** Colony-Forming Unit

**DCs:** Dendritic Cells

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**GM-CSF:** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

**HLA:** Human Leukocyte Antigen

**hsa-miR:** *Homo sapiens* micro RNAs

**IL:** Interleucina

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor kappa B

**O. D.:** Optical density

**PAMPs:** Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**RT-qPCR:** Real-time reverse transcription polymerase chain reaction

**TLR:** *Toll-like* receptor

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral alfa

## RESUMO

Células dendríticas (DCs) são essenciais para o reconhecimento de patógenos e apresentação de seus antígenos aos linfócitos T, desempenhando papel fundamental no elo entre as respostas imunes inata e adaptativa. A própolis é um produto resinoso, elaborado pelas abelhas a partir de diversas partes das plantas, e tem despertado a atenção dos pesquisadores em virtude de suas inúmeras propriedades biológicas, destacando sua ação imunomoduladora. Assim, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo investigar o efeito da própolis sobre a maturação e função de DCs humanas. Foi analisado o efeito da própolis na ativação do NF- $\kappa$ B, expressão de micro-RNAs e marcadores de superfície celular (TLR-4, MHC-II, CD80, CD86 e CD40), produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12), e atividade bactericida das DCs humanas contra *Streptococcus mutans*. Tomados em conjunto, os dados sugerem o perfil ativador da própolis em DCs, visto que este produto apícola manteve a ação induzida por LPS tanto na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B como na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. Ademais, a inibição na expressão de hsa-miR-148a e hsa-miR-148b aboliu o efeito inibitório dos mesmos sobre a expressão de HLA-DR e também pode ter favorecido a produção de citocinas pró-inflamatórias. O aumento na expressão de hsa-miR-155 pode estar correlacionado ao aumento na expressão de TLR-4 e CD86, além de manter a ativação induzida pelo LPS de HLA-DR e CD40. Estes parâmetros podem estar envolvidos com o aumento na atividade bactericida de DCs contra *Streptococcus mutans*. Estes dados sugerem que a própolis pode modular positivamente a maturação e função de DCs.

**Palavras-chave:** Células dendríticas, produtos naturais, produtos apícolas, própolis, citocinas, *Streptococcus mutans*.

## ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) represent a heterogeneous population of professional antigen presenting cells (APCs) and are essential for recognition and presentation of pathogens to T cells. Propolis, a resinous material produced by bees from various plant sources, exhibits numerous biological properties, highlighting its immunomodulatory action. Here, we assayed the effects of propolis on the maturation and function of human DCs, assessing the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, micro-RNAs and cell markers expression (TLR-4, HLA-DR, CD80, CD86, CD40), cytokines production (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12), and the bactericidal activity against *Streptococcus mutans*. DCs were generated from monocytes treated with IL-4 and GM-CSF and incubated with propolis and LPS. NF- $\kappa$ B in nuclear extract and cytokines were determined by ELISA. microRNAs expression was analysed by RT-qPCR and cell markers by flow cytometry. Colony-forming units were counted to assess the bactericidal activity of propolis-treated DCs. Propolis activated human DCs, inducing the NF- $\kappa$ B signaling pathway and TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 production. The inhibition of hsa-miR-148a and hsa-miR-148b abolished the inhibitory effects on HLA-DR and pro-inflammatory cytokines. The increased expression of hsa-miR-155 may be correlated to the increase in TLR-4 and CD86 expression, maintaining LPS-induced expression of HLA-DR and CD40. Such parameters may be involved in the increased bactericidal activity of DCs against *Streptococcus mutans*. These studies are particularly important to develop DC-based modulation strategies for the identification of promising sources for drug discovery.

**Keywords:** dendritic cells; natural product, bee product, propolis, cytokines, *Streptococcus mutans*.

## Sumário

### Lista de Abreviaturas e Siglas

### Resumo

### Abstract

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>                                                                             | <b>10</b> |
| <b>2. Objetivos.....</b>                                                                              | <b>21</b> |
| <b>3. Material e Métodos.....</b>                                                                     | <b>23</b> |
| 3.1. Obtenção das amostras de própolis.....                                                           | 24        |
| 3.2. Aspectos éticos, indivíduos e obtenção de células dendríticas a partir de monócitos humanos..... | 24        |
| 3.3. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT.....                                      | 25        |
| 3.4.Detecção do NF-kB no extrato nuclear.....                                                         | 26        |
| 3.5.Expressão de micro-RNAs (hsa-miR-155 e hsa-miR-148).....                                          | 26        |
| 3.6. Avaliação de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo.....                       | 27        |
| 3.7. Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).....                               | 29        |
| 3.8. Atividade bactericida de DCs.....                                                                | 29        |
| 3.9. Análise estatística.....                                                                         | 30        |
| <b>4. Resultados e Discussão.....</b>                                                                 | <b>31</b> |
| <b>5. Conclusões.....</b>                                                                             | <b>45</b> |
| <b>6. Referências Bibliográficas.....</b>                                                             | <b>47</b> |
| <b>Manuscrito.....</b>                                                                                | <b>58</b> |
| <b>Anexos.....</b>                                                                                    | <b>78</b> |

# *Introdução*

## 1. Introdução

Células dendríticas (DCs) são uma das principais células apresentadoras de antígeno do sistema imune. Estas células foram descobertas por Steinman & Cohn, em 1973, como uma nova linhagem de células nos órgãos linfóides de camundongos. Distinta dos macrófagos e por possuir tantas projeções do citoplasma, receberam o nome de células dendríticas (do grego “dendron”, que significa árvore) (STEINMAN & COHN, 1973).

Embora DCs constituam apenas cerca de 1% de leucócitos mononucleares no sangue periférico, estas células estão localizadas em outros tecidos periféricos onde podem atuar como sentinelas do sistema imunológico, patrulhando antígenos continuamente (JOFFRE *et al.*, 2009).

DCs se originam na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes. Estas células dão origem a duas linhagens de DCs: mielóides e linfóides (BANCHEREAU *et al.*, 2000; SHORTMAN & NAIK, 2002). A linhagem mielóide dá origem às chamadas DCs convencionais ou “mielóides”, incluindo as células de Langerhans (LCs), células dendríticas intersticiais (IDCs) e células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (SZABOLCS *et al.*, 1996; GATTI *et al.*, 2000). Estas últimas são caracterizadas pelo seu estado “imaturo” e encontram-se no tecido epitelial. Após o contato com estímulos, migram para os linfonodos para finalizar seu processo de maturação. Estas células produzem grandes quantidades de TNF- $\alpha$  em resposta a patógenos e outros agentes inflamatórios (ROSSI & YOUNG, 2005). As LCs e IDCs estão distribuídas em locais onde ocorre o primeiro encontro do antígeno com células envolvidas na resposta imune. Assim, as LCs estão localizadas em tecidos periféricos, particularmente em locais de interface com o meio externo, tais como pele e mucosa, e as IDCs nos tecidos subpiteliais da derme e interstício de órgãos sólidos, formando um sistema de vigilância e atuando como “sentinelas” do organismo, tendo como objetivo principal detectar e capturar antígenos externos (ROSSI & YOUNG, 2005). Já as DCs linfóides ou plasmocitóides possuem morfologia similar à de plasmócitos produtores de anticorpos. É a maior fonte de citocinas antivirais, como interferon do tipo I, respondendo precocemente nas infecções virais. Esta característica das DCs plasmocitóides se deve ao fato de expressarem fortemente os *Toll-like receptors* (TLR) endossômicos (TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9), que reconhecem ácidos nucleicos virais que foram internalizados por estas células.

DCs imaturas residentes em diferentes tecidos e órgãos são capazes de capturar e processar antígenos (CELLA *et al.*, 1997). Após ativação por micro-organismos, essas células migram para os linfonodos e baço onde ativam as células T não sensibilizadas. Durante essa migração, as DCs sofrem o processo de maturação que é crucial para o desenvolvimento dessas células em potentes células apresentadoras de antígenos (APCs).

Alguns tipos celulares podem exercer a função de APCs como macrófagos, monócitos, linfócitos B e células endoteliais. Porém, as DCs são consideradas as APCs mais potentes, sendo capazes de iniciar a resposta imune pela ativação de linfócitos T *naïve*. Além disso, têm importante papel na regulação da resposta imune mediada por linfócitos T, determinando o balanço entre os perfis Th1, Th2, Th17 e a ativação de linfócitos T reguladores (Treg) (DE JONG *et al.*, 2005).

No processo de maturação as DCs perdem a capacidade de capturar e processar antígenos, e aumentam a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86) (FURGIERVIVIER *et al.*, 1997). Além de interagir com os linfócitos nos órgãos linfóides, as DCs também podem ter contato com outros tipos celulares, incluindo linfócitos B e células NK, e também podem permanecer nos tecidos periféricos, atuando em processos inflamatórios (SHORTMAN & NAIK, 2002).

Em suma, células imaturas possuem altos níveis de receptores para quimiocinas (CCR) como CCR1, CCR5 e CCR6, baixos níveis de CCR7 e das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40, enquanto células maduras caracterizam-se pela grande expressão de moléculas de MHC-II, CCR7, CD80, CD86 e CD40. Assim, a maturação transforma uma célula captadora de antígenos em uma eficiente célula apresentadora, provocando uma mudança essencial ao desenvolvimento da resposta imune.

Em contraste com inúmeros estudos realizados com DCs murinas, há proporcionalmente poucos estudos com DCs humanas. Células provenientes do sangue periférico são as mais estudadas e compreendem DCs imaturas, que na sua grande maioria são bastante heterogêneas. A partir de estudos *in vitro* surgiu o conceito da existência de diferentes vias de diferenciação de DCs humanas (SHORTMAN & NAIK, 2002).

SALLUSTO & LANZAVECCHIA (1994) foram os primeiros autores a descrever DCs provenientes de monócitos sanguíneos, que são as células mais comuns e estudadas do sistema

imune. Monócitos apresentam receptores para quimiocinas, citocinas e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), possuindo a capacidade de migrar do sangue periférico para os tecidos durante os processos infecciosos. Estas células fagocíticas produzem citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), anti-inflamatórias (IL-10), se diferenciam em macrófagos e DCs durante os processos inflamatórios, sendo fundamentais na resposta imune inata a micro-organismos patogênicos (WU & LIU, 2007; AUFFRAY *et al.*, 2009; KVISTBORG *et al.*, 2009; GEISSMANN *et al.*, 2010).

DCs podem ser diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos na presença de citocinas como IL-4 e o fator estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Este fator pertence à classe de citocinas envolvidas na produção e na própria função das células hematopoiéticas. GM-CSF foi inicialmente identificado como um fator que levava à proliferação e diferenciação dos monócitos e granulócitos, tendo sido, posteriormente, demonstrada a sua influência na sobrevivência e função de granulócitos e macrófagos maduros. Assim, o GM-CSF é uma citocina multifuncional que modula o crescimento e a função da maioria das células leucocitárias. No caso específico das DC, desde o final da década de 80 e início dos anos 90, é reconhecido o papel fundamental do GM-CSF como mediador da sua diferenciação e crescimento a partir de células mononucleares do sangue periférico, assim como na sua viabilidade, maturação e função (MARKOWICZ & ENGLEMAN, 1990). Por outro lado, a IL-4 inibe a diferenciação de monócitos em macrófagos (CONTI *et al.*, 2008), e a combinação destas citocinas para a obtenção de DCs com fenótipo imaturo a partir da diferenciação de monócitos foi descrita por SALLUSTO & LANZAVECCHIA, em 1994. Essa metodologia foi estabelecida no propósito de obter culturas de DCs imaturas *in vitro* sem alterar as características fenotípicas e funcionais, e também com a finalidade de explorar sua capacidade apresentadora de antígeno, comparando-as com outras APCs, bem como identificando sinais que modulam a função de captura e processamento de antígenos (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994).

A estimulação de monócitos com GM-CSF e IL-4 *in vitro* induz a diferenciação de DCs a um fenótipo imaturo, que expressa altos níveis de CD11c, CD1a, baixa expressão de moléculas de adesão (LFA-1, ICAM-1 e LFA-3), antígenos do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (HLA-DR) e moléculas de coestimulação (CD40, B7-1/CD80, B7-2/CD86). Essas células não expressam CD14/CD16 e são especializadas na captura e processamento de antígenos (PEREIRA *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2010; ELKORD *et al.*, 2005).

Para confirmação da diferenciação em DCs a partir de monócitos, pode-se analisar a expressão de CD14<sup>+</sup>/CD1a<sup>high</sup>/CD83<sup>low</sup>, característica de DCs humanas imaturas. A proteína CD1a é expressa em DCs humanas em seu estágio precoce de maturação e são amplamente utilizados como marcadores DC humanas (BRIGL & BRENNER, 2004). Na figura 1 estão representadas células dendríticas no sétimo dia de cultivo, sendo possível observar o grande citoplasma e as pequenas projeções do mesmo, definidas como “dendrons” (setas pretas) – característica morfológica de DCs imaturas.

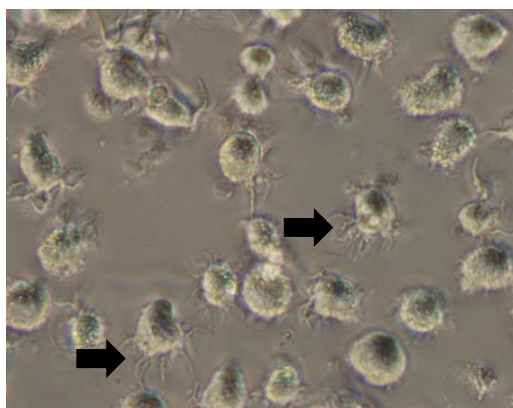


Figura 1. Células dendríticas imaturas ao sétimo dia de cultivo com IL-4 e GM-CSF em meio RPMI completo observadas no microscópio invertido (aumento 40x). As setas pretas indicam pequenas projeções do citoplasma, característica morfológica de DCs. Fonte: arquivo pessoal.

O contato com diferentes moléculas induz a maturação das DCs, processo que se caracteriza pela ativação de fatores de transcrição, expressão de marcadores de superfície e secreção de citocinas. Este processo é crítico para que as DCs possam ativar de forma eficiente os linfócitos T *naïve*.

O NF- $\kappa$ B é um dos fatores de transcrição presentes em vários tipos celulares, inclusive em DCs. Este fator foi descoberto em 1986, e apresenta capacidade de realizar a transcrição gênica somente quando localizado no núcleo celular. No citoplasma, é incapaz de regular a transcrição, devido ao controle realizado pelo inibidor de  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) que se liga ao NF- $\kappa$ B, mantendo-o inativo no citoplasma. Para que isto ocorra, uma outra proteína conhecida como IKK precisa ser fosforilada e ativada pelo pAkt, sendo então capaz de fosforilar o I- $\kappa$ B, levando-o para ubiquitinação e consequente degradação. Na ausência do I- $\kappa$ B, o NF- $\kappa$ B vai até o núcleo onde é capaz de exercer sua função, induzindo a transcrição de vários genes (CHANG *et al.*, 2003; DOLCET *et al.*, 2005). A ativação do NF- $\kappa$ B é um evento que deve ser muito bem

regulado e, em células normais, este fator só é ativado depois de receber o correto estímulo que o leve a transcrever os genes-alvo.

Além dos fatores de transcrição, uma nova classe descrita de reguladores gênicos são os microRNAs (miRNAs), sendo esta uma importante descoberta da biologia molecular nas últimas décadas. miRNAs consistem em pequenos fragmentos conservados de RNA com aproximadamente 18 a 24 nucleotídeos. Os miRNAs regulam a expressão gênica pelo pareamento imperfeito com sequências alvos de RNA mensageiro (mRNA) (GANGARAJU & LIN, 2009; MCCARTHY, 2010). Os miRNAs receberam atenção especial devido à sua importância na manutenção da homeostase em estados não-patológicos, estando desregulados em condições patológicas.

Os miRNAs são codificados por genes específicos expressos no núcleo. São transcritos pela RNA polimerase II e chamados de transcritos primários, ou pri-miRNAs que são longas sequências flanqueadas de um lado por outras bases não pareadas e de outro pela região *loop*, onde os pares de bases não são complementares, formando alças circulares e assumindo um formato de “grampo de cabelo” (*hairpin*). Dentro do núcleo, as regiões não pareadas são clivadas pela RNase III Drosha e Parsha/DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), permanecendo a região central e o *loop* de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominados pré-miRNAs. Os pré-miRNAs são transportados para o citoplasma via exportina-5 e clivados pelo complexo enzimático RNase III Dicer/Argonauta que remove a alça terminal (*loop*), formando uma dupla de miRNAs com aproximadamente 22 nucleotídeos. Após este processo, uma das fitas é degradada e a outra funcional é incorporada ao complexo silenciador RNA-induzido (RISC), formado por várias proteínas que guiam a maquinaria silenciadora para o RNA mensageiro alvo, inibindo a tradução ou promovendo a degradação deste. Em geral, os miRNAs não desligam completamente a expressão dos seus genes, mas ajustam sua expressão (BARTEL, 2009; LI *et al.*, 2010; HARRIS *et al.*, 2010; SARMA *et al.*, 2012).

Embora mais de 4523 miRNAs humanos já tenham sido registrados no banco de dado microRBase (<http://www.mirbase.org/>; miRBase v. 21.0), suas funções no sistema imune, especialmente no desenvolvimento e função das DCs, apenas agora começaram a ser exploradas, sendo muitas delas desconhecidas (ANGLICHEAU *et al.*, 2009; HARRIS *et al.*, 2010; HARTONO *et al.*, 2010). Os miRNAs têm múltiplos mRNAs como alvo, e podem regular a expressão gênica de milhares de genes, direta ou indiretamente. Pesquisas têm demonstrado o envolvimento de uma série de miRNAs na regulação da resposta imunológica, incluindo o

desenvolvimento e diferenciação das células B e T (miRNA-181a, miR-155) (LI *et al.*, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2007), de monócitos e neutrófilos (miR-17-5p, miR-20a, miR-106a, miR-223) (FONTANA *et al.*, 2007; JOHNNIDIS *et al.*, 2008), a produção de citocinas inflamatórias e IFN tipo I (miR-146a, miR-155, miR-21) (TAGANOV *et al.*, 2006; SHEEDY *et al.*, 2010), sinalização via receptores de células T e TLRs, função de células Treg, entre outros (HARRIS *et al.*, 2010; SARMA *et al.*, 2012).

Um único miRNA é capaz de regular a expressão de centenas de mRNAs e proteínas, controlando processos como desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular e demonstrando sua habilidade em modular ambas as respostas imunes inata e adaptativa. As funções dos miRNAs nas células do sistema imune têm sido de grande interesse. Como exemplo, o miR-155 está envolvido em processos de maturação de linfócitos B e T, produção de imunoglobulinas, estimulação de macrófagos, e a expressão de TLRs em DCs (CALAME, 2007; O'CONNELL *et al.*, 2007; THAI *et al.*, 2007).

A expressão de miR-155 por DCs murinas é um processo importante e implicado tanto na maturação como na função destas células. Estudos evidenciaram que DCs de camundongos miR-155-deficientes exibiram respostas imunes prejudicadas em relação ao reconhecimento e processamento de antígenos e capacidade diminuída em ativar células T (RODRIGUEZ *et al.*, 2007; DUNAND-SAUTHIER *et al.*, 2011). Essa observação pode ser, em parte, devida à reduzida ativação de TLR e expressão de CD40 e CD86 (DUNAND-SAUTHIER *et al.*, 2011; MAO *et al.*, 2011).

Outro microRNA importante são os membros da família do miR-148 (miR-148a, miR-148b, e miR-152). Estes miRNAs regulam positivamente a estimulação de DCs por LPS. Sua super-expressão está associada à redução de moléculas como MHC-II e à inibição de algumas citocinas pró-inflamatórias, assim como reduzida expansão de células T CD4<sup>+</sup> (LIU *et al.*, 2010). Correspondentemente, foi observado um aumento na expressão de MHC-II, na produção de citocinas e proliferação das células T CD4<sup>+</sup> em culturas DC estimuladas por LPS, quando estas células foram tratadas com inibidores da família de miR-148. Estudos revelaram que região 3'UTR do gene que codifica a cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II (CaMKIIα) contém uma sequência alvo para o miR-148/152. CaMKIIα é uma molécula efetora na transdução de sinal mediada pelo cálcio a várias proteínas, incluindo canais iônicos e ativadores de transcrição, desempenhando um importante papel na regulação da maturação e função de DCs (HERRMANN *et al.*, 2005). Assim, a expressão dos miR-148/152 regula os

processos de maturação e ativação das DCs induzida por agonistas de TLR, podendo inibir a apresentação de antígenos por estas células.

Os membros da família TLRs são receptores transmembrânicos, caracterizados por possuírem um domínio extracelular e outro intracelular, e desempenham uma função importante na resposta imunológica inata e no reconhecimento de produtos ou estruturas microbianas conservadas (PAMPs). Assumem função única e essencial na imunidade, desempenhando um papel de grande importância na detecção da infecção microbiana e na indução da expressão de genes antimicrobianos. A especificidade dos TLR para produtos de origem microbiana permite detectar o tipo de infecção e direcionar uma resposta imunológica adquirida contra os antígenos (TAKEDA & AKIRA, 2005). TLR-2 reconhece uma grande quantidade de produtos microbianos, como peptidoglicanos, LPS, lipoproteínas, componentes de parede celular de micobactérias, dentre outros. Tal variedade de ligantes pode ser explicada, em parte, pela cooperação existente entre TLR-2 e TLR-1 ou TLR-2 e TLR-6, ocorrendo formação de heterodímeros. Já TLR-4 tem como agonistas LPS, ácido lipoteicoico e a proteína de fusão F do vírus respiratório sincicial. Ácidos nucleicos virais ou bacterianos são reconhecidos por TLR-3/7/8 e 9, enquanto TLR-5 tem como ligante a flagelina bacteriana (TAKEDA & AKIRA, 2005). Estes receptores são expressos constitutivamente em DC imaturas derivadas da medula óssea. O reconhecimento de produtos microbianos pelos TLR desencadeia a maturação funcional destas células, levando ao início da resposta imunológica adquirida.

Após ocorrer a interação entre as DCs e o antígeno, esse evento resulta em mudanças fenotípicas devido ao aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias e funcionais. As moléculas co-estimulatórias melhor caracterizadas estruturalmente são as da família B7, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (B7-1 ou CD80, e B7-2 ou CD86), que foram os primeiros membros descritos desta grande família B7. Estas moléculas co-estimulatórias são expressas exclusivamente na superfície das células que têm a capacidade de estimular a proliferação dos linfócitos T, como é o caso das DCs. Além da descoberta destas duas moléculas, foi caracterizada uma outra molécula co-estimulatória, o CD28, expressa nos linfócitos T. Esta molécula constitui o receptor dos linfócitos T para as moléculas B7, pertencendo também à família das imunoglobulinas. A ligação de moléculas B7 ao CD28 intensifica a expansão clonal de linfócitos T *naïve* (JANEWAY, 2001). A expressão das moléculas CD80 e CD86 aumenta após ativação e maturação destas células e, deste modo, as DCs tornam-se aptas a apresentarem os antígenos e ativarem linfócitos T *naïve* (FRLETA *et*

*al.*, 2003). Esta interação também induz a produção de uma variedade de citocinas incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, todas envolvidas na ativação e proliferação dos linfócitos T *naïve* (BANCHEREAU *et al.*, 2000; WESA & GALY, 2002).

As citocinas, assim como as quimiocinas, são um grupo de moléculas solúveis que participam na interação entre DCs e linfócitos T. A produção de citocinas pelas DCs pode ser influenciada por diferentes estados de maturação/ativação das mesmas. Citocinas como o TNF- $\alpha$  são importantes no processo de ativação de DCs, enquanto que outras citocinas, como a IL-10, são consideradas fatores de desativação celular. A IL-6 atua tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa. Na imunidade inata, atua como estímulo para a produção de neutrófilos e síntese de proteínas de fase aguda; já na imunidade adaptativa, atua na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (YOON *et al.*, 2009). A produção de IL-6 pode ser estimulada por citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e tem sido cada vez maior o número de trabalhos que demonstram a ambiguidade da IL-6, por possuir tanto efeitos anti-inflamatórios quanto pró-inflamatórios.

A IL-12 é uma citocina com importante função no início e regulação da resposta imune celular. A IL-12 é uma citocina formada por duas cadeias, a IL-12p35 e a IL-12p40, sendo que a subunidade IL-12p40 também é comum à IL-23, formando um heterodímero com a cadeia IL-23p19, sendo ambas as citocinas IL-12 e IL-23 produzidas por APCs ativadas (OPPMANN *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2004). Esta citocina possui a capacidade de promover a diferenciação de células T *naïve* em Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , as quais são fundamentais para o desenvolvimento da imunidade celular e resistência contra patógenos intracelulares (ALBER *et al.*, 2006). A IL-12 estimula também a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e linfócitos T.

A resposta imune/inflamatória pode ser modulada por inúmeros fatores, dentre eles, os produtos naturais. Vários estudos têm demonstrado a utilização da própolis para diferentes finalidades, e aqui destacamos sua ação imunomoduladora, influenciando tanto os eventos iniciais da resposta imune como a resposta adaptativa.

A própolis tem sido objeto de investigação de nosso grupo de pesquisa há duas décadas. Material resinoso e balsâmico, coletado e processado pelas abelhas a partir de diversas partes das plantas, a própolis tem despertado o interesse de vários pesquisadores por possuir inúmeras propriedades biológicas tais como imunomoduladora, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (SFORCIN *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2001; SFORCIN *et al.*,

2002; SALATINO *et al.*, 2005; ORSOLIC *et al.*, 2006; SFORCIN, 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2011; WATANABE *et al.*, 2011).

Com relação ao sistema imunológico, dados de nosso grupo evidenciaram que a própolis modula os eventos iniciais da resposta imune, induzindo a expressão de receptores semelhantes a Toll (TLR-2 e TLR-4) e produção de citocinas pró-inflamatórias (ORSATTI *et al.*, 2010), bem como a geração de espécies reativas do oxigênio ( $H_2O_2$ ) por macrófagos peritoneais de camundongos (ORSI *et al.*, 2000). Observamos também que a própolis induziu aumento na atividade fungicida de macrófagos contra *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD *et al.*, 2002) e na atividade bactericida contra *Salmonella* Typhimurium, envolvendo a participação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio (ORSI *et al.*, 2005).

Ratos tratados com própolis apresentaram maior produção de anticorpos (SFORCIN *et al.*, 2005), e camundongos inoculados com vacina inativada de herpes tipo-1 Suid (SuHV-1) associada à própolis apresentaram aumento dos níveis de anticorpos, sugerindo sua utilização como adjuvante vacinal (FISCHER *et al.*, 2007). Por outro lado, ao avaliar a influência do extrato de própolis sobre a resposta linfoproliferativa de camundongos e sobre a produção de interferon (IFN)- $\gamma$ , verificamos que a própolis apresentou efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos *in vitro* e *in vivo* (SÁ-NUNES *et al.*, 2003). ANSORGE *et al.* (2003) observaram que a própolis é capaz de suprimir a síntese de DNA de células mononucleares do sangue periférico e de células T humanas, não havendo alteração da viabilidade celular em presença da própolis. Estes mesmos autores relataram que a própolis inibe a produção de IL-12, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, mas não a produção do fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). A IL-12 é uma citocina capaz de direcionar a diferenciação de células T para um padrão Th1 de resposta e, considerando que a própolis inibe a produção desta citocina, bem como a produção de IL-4, os autores sugeriram que a própolis poderia modular a ativação tanto de células Th1 como Th2.

Estas observações apontam nitidamente a capacidade deste produto apícola em modular a resposta imunológica, uma vez que, em virtude da concentração, período de incubação ou ingestão, vias de administração, entre outros fatores, os diferentes ensaios realizados *in vitro* ou *in vivo* revelaram ação imunoestimulante ou inibitória. Ademais, a maioria dos trabalhos sobre a ação imunomoduladora da própolis foi realizada com animais de experimentação, havendo poucos dados sobre seu efeito em células humanas. Recentemente, avaliamos a ação moduladora da própolis e do ácido cinâmico (componente isolado) sobre a ativação de

monócitos humanos. A própolis e o ácido cinâmico induziram a expressão de receptores celulares (TLR-2, TLR-4, MHC-II, CD80), a produção de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10) e a atividade fungicida de monócitos, em concentrações diferentes (CONTI *et al.*, 2013; BÚFALO *et al.*, 2014).

Diante das observações expostas, este trabalho foi delineado visando analisar os efeitos da própolis sobre a maturação e função de DCs humanas. Assim, foi possível verificar o efeito deste apiterápico quanto à ativação do NF-kB e à expressão de micro-RNAs (miR-148 e miR-155). Foi analisada também a expressão de marcadores de superfície celular (TLR-4, HLA-DR, CD40, CD86 e CD80) e a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, e IL-12) por DCs humanas, correlacionando estes parâmetros com a atividade bactericida contra *Streptococcus mutans*.

A realização deste trabalho trouxe importantes contribuições quanto aos mecanismos de ação da própolis, investigando a hipótese de que este apiterápico poderia favorecer os eventos iniciais da resposta imune, modulando positivamente a atividade das DCs. Tal aspecto pode ser de interesse para a indústria farmacêutica futuramente, evidenciando a aplicabilidade de nossos resultados.

Ao final da tese, encontra-se redigido o manuscrito a ser submetido à publicação junto a revista Immunology, intitulado “**Propolis influences the maturation and function of human dendritic cells**”.

## *Objetivos*

## 2. Objetivos

- ✓ Verificar o possível efeito citotóxico da própolis sobre células dendríticas de indivíduos saudáveis.
- ✓ Avaliar a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, após o tratamento com própolis.
- ✓ Verificar a expressão de micro-RNAs (miR-155 e miR-148) pelas DCs, após incubação com o produto apícola, e sua influência nos demais parâmetros.
- ✓ Analisar a ação da própolis sobre a expressão de marcadores de superfície celular (TLR-4, MHC-II, CD40, CD80 e CD86), por citometria de fluxo.
- ✓ Avaliar o efeito deste apiterápico sobre a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12), por ensaio imunoenzimático (ELISA).
- ✓ Analisar a ação bactericida de células dendríticas tratadas com própolis sobre *Streptococcus mutans*.

# *Material e Métodos*

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Obtenção das amostras de própolis**

A própolis foi produzida por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), no apiário localizado na Fazenda Experimental Lageado, (UNESP, Campus de Botucatu). As amostras foram obtidas através de telas propolisadoras, posteriormente congeladas para facilitar a remoção da própolis. Em seguida, a própolis foi triturada e extraída (30 g de própolis, completando o volume para 100 mL com etanol 70%), em ausência de luz e sob moderada agitação. Após uma semana, os extratos foram filtrados em papel de filtro e foi calculado o peso seco da solução (130 mg/mL) (SFORCIN *et al.*, 2005).

A própolis foi diluída em meio RPMI completo, contendo 0,1 g/L de L-glutamina, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 10 mL/L de aminoácidos não essenciais e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após filtração, foram realizadas diluições para se obter as concentrações de 5, 10, 20 e 40 µg/mL de própolis. O mesmo procedimento foi realizado com o etanol 70% (solvente da própolis), nas mesmas proporções encontradas nas concentrações de própolis.

#### **3.2. Aspectos éticos, indivíduos e obtenção de células dendríticas a partir de monócitos humanos**

O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento (Anexo 1). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CEP – 4321-2012 – Anexo 2).

Foram avaliadas DCs provenientes de monócitos humanos obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e voluntários do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu. Estas células foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), após centrifugação a 1500 rpm por 20 minutos. O anel rico em células mononucleares foi coletado em tubos Falcon, e em seguida a suspensão celular foi lavada duas vezes com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) por 10 minutos a 1200 rpm, para total remoção das plaquetas.

As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino (SFB). A contagem, identificação e a viabilidade das

células mononucleares foram realizadas através da coloração com Azul Tripán (alíquotas de 50 µL da suspensão celular com 50 µL da solução do corante a 0,02%). A suspensão então foi ajustada para  $5 \times 10^6$  células/mL com posterior plaqueamento de 2 mL da suspensão em placas de macrocultura com 6 poços.

Após plaqueamento, as culturas celulares foram incubadas por 2 h a 37°C em tensão de 5% de CO<sub>2</sub> para aderência dos monócitos. Após esse período, as células não aderentes foram removidas através da lavagem das placas com meio de cultura RPMI 1640. Em seguida, foram adicionados na cultura celular 2 mL de RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal inativado, acrescido de IL-4 recombinante humana (80 ng/mL) e GM-CSF recombinante humano (80 ng/mL). Após 3 dias, o sobrenadante da cultura celular foi descartado, e as duas citocinas foram adicionadas novamente. Após 7 dias de cultivo, as células frouxamente aderidas foram recolhidas com auxílio de pipeta, e lavadas com meio completo. A suspensão celular foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células dendríticas/mL e distribuída em placas de 24 poços (0,5 mL/poço), juntamente com os estímulos para a realização dos ensaios propostos.

O primeiro ensaio realizado foi a fenotipagem das células para confirmação da diferenciação dos monócitos em DCs, analisando a expressão de alguns marcadores de superfície celular: CD14<sup>-</sup>/CD1a<sup>high</sup>/CD83<sup>low</sup>, os quais são característicos de células dendríticas imaturas (BYKOVSKAIA *et al.*, 2002; POLANCEC *et al.*, 2012).

### **3.3. Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT**

Quinhentos microlitros da suspensão celular  $1 \times 10^6$  células/mL foram adicionados em placas de 24 poços, incubando-se a 37°C sob pressão constante de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h, na presença de extrato hidroalcoólico de própolis, nas seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 40 µg/mL simultaneamente com LPS (10 µg/mL). Células controle foram incubadas somente com meio de cultura. A viabilidade celular foi analisada através do teste colorimétrico de MTT adicionando-se 300 µL de MTT por 3 horas; após esse período, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 200 µL DMSO, promovendo a lise celular e a detecção dos cristais de formazan, decorrentes da atividade mitocondrial das células viáveis. A leitura da densidade óptica foi realizada a 540 nm, e a viabilidade foi analisada para utilizar concentrações de própolis que não apresentaram citotoxicidade nos demais ensaios.

### 3.4. Detecção do NF-κB no extrato nuclear

Para avaliação do fator de transcrição NF-κB, DCs foram pré-incubadas com as concentrações de própolis por 2 h e então estimuladas com LPS (10 µg/mL) por 45 minutos (WANG *et al.*, 2009). Em seguida, as DCs foram lavadas com PBS contendo 10% de soro fetal bovino livre de endotoxina em gelo. As células foram lisadas utilizando o kit de extração nuclear. O extrato nuclear de cada cultura foi obtido e estocado a -80°C para posterior análise. A porção nuclear da p65NF-κB foi detectada pela técnica de ELISA, utilizando kits comerciais (Cayman Chemical Company, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificada a 450 nm com comprimento de onda referente a 655 nm (BANNWART *et al.*, 2010).

### 3.5. Expressão de micro-RNAs (hsa-miR-155 e hsa-miR-148)

A suspensão de células dendríticas foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL e incubada com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20 e 40 µg/mL) e LPS (10 µg/mL) por 12 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos para a remoção do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 500 µL de Trizol, e posteriormente mantido a -80°C para o início do ensaio de extração.

Foi realizada RT-PCR para analisar a expressão gênica do hsa-miR-148a, hsa-miR-148b e hsa-miR-155 após tratamento de DCs humanas com própolis. Os oligonucleotídeos utilizados para análise encontram-se na tabela 1. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE (*Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment*).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão dos microRNAs.

| microRNA humano (hsa*) | Sequência alvo         |
|------------------------|------------------------|
| hsa-mir-148a-3p        | UCAGUGCACUACAGAACUUUGU |
| hsa-mir-148b-3p        | UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU |
| hsa-mir-155-5p         | UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGG |

\* hsa: *Homo sapiens*, indicando ser um microRNA humano.

A extração do RNA foi realizada com o kit mirVana (Ambion, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNase (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific, EUA).

A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microflúidos, utilizando-se o sistema 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA) (FLEIGE & PFAFFL, 2006; BECKER *et al.*, 2010).

A transcrição reversa dos microRNAs foi realizada utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA) combinado com o Stem-loop Megaplex™ RT Primers (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas de microRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico. Para a reação, foram adicionados os seguintes componentes do kit ao RNA total: Megaplex™ RT Primers (10X), dNTPs com dTTP, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, RT Buffer, RNase Inhibitor, e o volume completado com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 40 ciclos de 16°C por 2 min, 42°C por 1 min e 50°C por 1s, seguido da inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min.

Cada amostra de cDNA (miRNAs) foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA), contendo os primers específicos para cada microRNA. Para cada reação, foram utilizados TaqMan®, TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Life Technologies, EUA), produto da reação de transcrição reversa, e o volume final ajustado com água livre de nucleases. Foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min. As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real 7300 HT (Life Technologies, EUA). Os valores de Cq (ciclo de quantificação) foram calculados utilizando o software SDS 1.4, utilizando a configuração automática de *baseline* e a determinação manual de *threshold* para cada alvo. O Cq refere-se ao ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo baseline e o threshold (de acordo com o RDML, <http://rdml.org>). A quantificação relativa da expressão dos miRNAs foi realizada pelo método do Cq comparativo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

### **3.6. Avaliação de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo**

O primeiro ensaio realizado foi a fenotipagem das células para confirmação da diferenciação dos monócitos em DCs, analisando a expressão de alguns marcadores de superfície celular: CD14<sup>-</sup>/CD1a<sup>+</sup>/CD83<sup>low</sup>, os quais são característicos de células dendríticas imaturas (BYKOVSKAIA *et al.*, 2002; POLANCEC *et al.*, 2012).

Após a fenotipagem foram realizados os ensaios para a avaliação da presença dos seguintes marcadores celulares: TLR-4, HLA-DR, CD-80, CD83, CD86 e CD40. DCs (1 x 10<sup>6</sup> células/mL) foram colocadas em tubos Falcon de poliestireno para citômetro (BD Becton Dickinson and Company) no volume de 500 µL e centrifugadas por 10 minutos a 1700 rpm. O sobrenadante foi descartado e as culturas foram incubadas com a própolis nas seguintes concentrações: 5, 10, 20 e 40 µg/mL e LPS (10 µg/mL), por 24 h a 37°C, sob tensão de 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II). A análise fenotípica foi realizada incubando as DCs com anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: 1 µg/mL de anti-CD14 conjugado com PerCP / Cy5.5 (clone HCD14 - BioLegend, EUA), 0.50 µg/mL de anti-CD1a conjugado com FITC (clone HI149 - BioLegend, EUA) e 1 µg/mL de anti-CD83 conjugado com APC (clone HB15e - BioLegend, EUA), que são característicos de DCs imaturas (BYKOVSKAIA *et al.*, 2002; POLANCEC *et al.*, 2012).

As células foram separadas em dois grupos (A e B). No grupo A, as células estimuladas foram incubadas com 2 µg/mL de anticorpos anti-CD86 conjugado com ALEXA Fluor 488 (clone IT2.2 - Biolegend, San Diego, CA, EUA), 1 µg/mL de anti-CD80 conjugado com PE (clone D210 - Biolegend, San Diego, CA, EUA) e 0,5 µg/mL anti-CD40 conjugado com PerCP/Cy5.5 (clone 5C3 - Biolegend, San Diego, CA, EUA). No grupo B, as DCs foram incubadas com 0,5 µg/mL dos anticorpos anti-HLA-DR conjugado com FITC (clone L243 - Biolegend, San Diego, CA, EUA) e 1 µg/mL de anti-TLR-4 conjugado com PE (clone HTA125 - Biolegend, San Diego, CA, EUA).

Para cada teste, foi incluído um tubo controle onde as células foram incubadas com 2 µg/mL dos anticorpos de controle isotípico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes (PE, FITC, APC e PerCP/Cy5.5) durante 30 minutos ao abrigo da luz à 4°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1700 rpm para lavagem, fixadas em 450 µL de ISOTON II contendo 50 µL de *p*-formaldeído 5% e analisadas por citometria de fluxo (NAKAIRA-TAKAHAGI *et al.*, 2011).

As análises foram realizadas em citômetro modelo FACSCalibur™ (Beckton Dickinson) utilizando o software CellQuest para adquirir e analisar multiparâmetros celulares.

Foi padronizada a aquisição de 10.000 eventos por amostras e foi otimizada a população de interesse estabelecendo *gate* com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Os resultados foram expressos em percentual de células CD83<sup>+</sup> nos eventos positivos, marcador específico de DCs humanas (NAKAIRA-TAKAHAGI *et al.*, 2011).

### **3.7. Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

As culturas de DCs, contendo  $1 \times 10^6$  células /mL, foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h em placas de 24 poços com própolis e com LPS (5 µg/mL). Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C, para posterior dosagem das citocinas pela técnica de ELISA (WANG *et al.*, 2009).

A determinação da concentração de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12p70 foi realizada pela técnica de ELISA, utilizando o kit adquirido da R & D Systems, EUA.

Inicialmente foram adicionados 100 µL de salina tamponada com fosfato (PBS) e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R & D Systems, EUA) às placas de poliestireno (Maxisorp-Nunc, EUA), e incubadas overnight a 4°C em câmara úmida. Após 3 lavagens dos poços com PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), houve o bloqueio dos poços com albumina sérica bovina em PBS (10%) para saturação dos sítios de ligação e, em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1h. A seguir, nova sequência de lavagens foi realizada e alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes das culturas de células foram adicionadas com posterior incubação por 2 h a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados e, ao anticorpo de detecção policlonal biotilado, foi adicionado o conjugado estreptoavidina-peroxidase, incubando-se novamente por 20 min. Novas lavagens foram realizadas e, para revelação, foram adicionados 100 µL da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB). Após 20 minutos a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 492 nm (TAN *et al.*, 2006).

### **3.8. Atividade bactericida de DCs**

Foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, cedidas pela Profa. Dra. Cristiane Duque, da Faculdade de Odontologia, UNESP, Campus de Araçatuba. As cepas foram semeadas em meio BHI a 35°C por 18h. Após este período, os micro-organismos foram

padronizados na escala 0,5 de MacFarland, em solução fisiológica estéril, contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

As proporções inicialmente testadas de DC/bactéria foram: 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 e 1:500, verificando que a melhor proporção foi de 1:5, a qual foi adotada por apresentar atividade bactericida na faixa de 20 a 30%, faixa esta classificada como ideal para verificar a ação estimuladora ou inibitória dos tratamentos sobre a atividade bactericida ou fungicida das células estudadas, a partir desta porcentagem (ORSI *et al.*, 2005).

As DCs foram obtidas como descrito anteriormente e, posteriormente à incubação destas com as variáveis em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24 h, os sobrenadantes das culturas foram retirados e as DCs foram desafiadas com as bactérias na proporção mencionada, por 2 h. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em tubos de ensaio previamente esterilizados. Os poços foram lavados com Triton X-100 a 1%, para remoção e lise das células, e, conseqüentemente, liberação das bactérias fagocitadas. Após este procedimento, foram feitas lavagens com solução salina para recuperação total das bactérias viáveis. O volume total obtido com a remoção do sobrenadante e as lavagens foi de 10 mL. Destes, 10 µL foram plaqueados em ágar BHI, para avaliar o posterior crescimento bacteriano e calcular a atividade bactericida das DCs. Após 48 h, o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Streptococcus mutans* foi determinado e a porcentagem (%) da atividade bactericida foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade bactericida} = [1 - \text{UFC das culturas experimentais} / \text{UFC controle}] \times 100$$

### 3.9. Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizada o software Graphpad Prism 5 (Graphpad San Diego CA, USA), utilizando a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

A análise do perfil de expressão dos microRNAs e dos mRNAs foi realizada utilizando-se o software Real Time StatMiner® (Integromics, Espanha) e, para análise estatística dos dados referentes aos microRNAs, a comparação dos dados foi realizada pelo teste *t* de Student, com  $p < 0,05$ .

# *Resultados e Discussão*

#### 4. Resultados e Discussão

A própolis tem sido objeto de investigação de nosso grupo de pesquisa há quase duas décadas. Material resinoso e balsâmico, coletado e processado pelas abelhas a partir de diversas partes das plantas, a própolis tem despertado o interesse de vários pesquisadores por possuir inúmeras propriedades biológicas tais como imunomoduladora, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras; bem como por seu potencial para desenvolvimento de novas drogas (SFORCIN *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2001; SFORCIN *et al.*, 2002; SALATINO *et al.*, 2005; ORSOLIC *et al.*, 2006; SFORCIN, 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2011; WATANABE *et al.*, 2011). A própolis é um produto que não apresenta toxicidade e efeitos colaterais após sua administração a ratos ou camundongos (SFORCIN *et al.*, 1995; MANI *et al.*, 2006).

Existem inúmeros estudos realizados com DCs murinas; em contraste, há relativamente poucos estudos em DCs humanas isoladas do sangue periférico, onde compreendem DCs plasmocitóides e DCs monocíticas imaturas. DCs encontradas no sangue humano são bastante heterogêneas, e a maior parte das informações referentes a estas células provêm de estudos *in vitro* (SHORTMAN & NAIK, 2002). Neste contexto, essas células podem ser provenientes de células precursoras como monócitos estimulados com determinadas citocinas, como IL-4 e GM-CSF, e subsequente diferenciação em células com características específicas de DCs (INABA *et al.*, 1992).

As células diferenciadas podem ser caracterizadas fenotipicamente por meio de marcadores de superfície, sendo consideradas DCs se forem positivas para a presença de alguns dos seguintes marcadores: CD1a, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR e negativas para o marcador CD14 (MacDONALD *et al.*, 2002).

Com o intuito de confirmar o fenótipo dessas células para que não houvesse dúvidas quanto a sua diferenciação de monócitos para DCs, realizamos ensaio de citometria de fluxo que nos possibilitou investigar a expressão de moléculas de superfície. A nossa busca foi por DCs com fenótipo imaturo. Em seguida, incubamos essas células com o estímulo (própolis) e LPS para promover o processo de maturação e caracterização dos parâmetros propostos a serem analisados neste projeto. Os resultados de fenotipagem permitiram concluir que a metodologia adotada foi eficiente, em todas as culturas obtivemos células que apresentaram diminuição da expressão da molécula CD14, alta expressão de CD1a e baixa expressão de CD83, fenótipo

característico de DCs imaturas ( $CD14^+/CD1a^{high}/CD83^{low}$ ) (BYKOVSKAIA *et al.*, 2002; POLANCEC *et al.*, 2012).

Uma vez caracterizadas fenotipicamente, incubamos as DCs com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20, e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h, e avaliamos o possível efeito deste apiterápico sobre a viabilidade das mesmas. Para tal, utilizamos o teste colorimétrico com o MTT, uma vez que trata-se de técnica acurada e segura, minimizando perdas celulares, já que o corante é adicionado diretamente às culturas celulares. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídios através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade das enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

Após a incubação das células com as diferentes concentrações de própolis e LPS por 24 h, realizamos o ensaio de viabilidade celular por MTT e, de acordo com os resultados obtidos, não houve efeito citotóxico de nenhuma das concentrações utilizadas (figura 2).

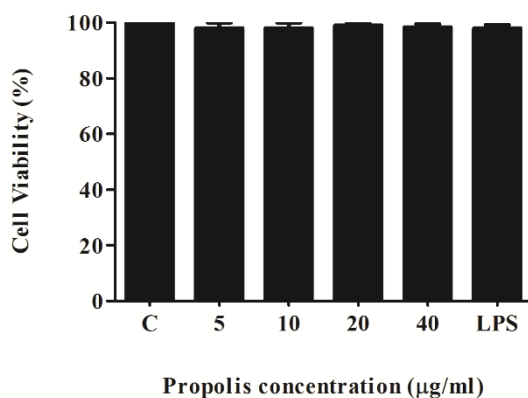


Figura 2. Viabilidade celular (%) de células dendríticas controle (C) ou incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20, e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h. Os dados representam média e o desvio-padrão de 10 ensaios similares ( $p>0,05$ ).

Segundo KIM & JOO (2008), a incubação de DCs com produtos naturais como fucoidan (classe de polímeros sulfatados encontrado em macroalgas) não interferiu na viabilidade das mesmas e demonstrou efeito imunoestimulatório, aumentando a expressão de marcadores como MHC-I e II, além das moléculas CD54 e CD86, importantes para a ativação da resposta imunológica.

Dados da literatura sugerem que viabilidade celular acima de 80% é representativa (KONG *et al.*, 2008) e, com base em nossos resultados, demos continuidade aos ensaios incluindo todas as concentrações de própolis, uma vez que a porcentagem de viabilidade encontrada foi praticamente de 100%.

DCs são as APCs mais potentes do sistema imune e, para estimular eficientemente as células T, têm que se tornar maduras num processo acompanhado por alterações funcionais e fenotípicas. DCs imaturas residem em tecidos periféricos e, após contato com antígenos ou exposição a estímulos inflamatórios, migram para os gânglios linfáticos proximais, onde ocorre sua maturação. No tocante às DCs maduras, estas células passam a expressar moléculas adicionais como MHC de classes I/ II e moléculas co-estimulatórias envolvidas na estimulação de células T (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). Após um estímulo inflamatório ou reconhecimento de microrganismos, no citoplasma das células há ativação de vias de transdução de sinal com ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B, e expressão de genes envolvidos na resposta imune, como citocinas.

Inicialmente, avaliamos a quantificação do NF- $\kappa$ B após incubação das DCs com própolis, analisando posteriormente a produção de citocinas. A atividade do NF- $\kappa$ B foi avaliada por meio de cultura de DCs humanas tratadas com própolis em diferentes concentrações por 2 h, seguido de incubação com LPS por 45 minutos (WANG *et al.*, 2009). Conforme visualizado na figura 3, o LPS estimulou a atividade deste fator de transcrição, quantificado somente na porção nuclear pela técnica de ELISA. O NF- $\kappa$ B não foi detectado na porção citoplasmática, pois o mesmo já se encontrava na porção nuclear. A própolis manteve este perfil ativador em todas as concentrações, não afetando a atividade do LPS, que foi nosso controle positivo.

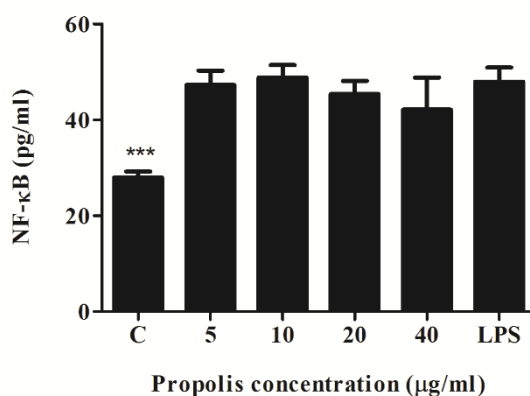


Figura 3. Quantificação de NF- $\kappa$ B (pg/mL) por células dendríticas controle (C) ou incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20 e 40  $\mu$ g/mL) por 2 h e posteriormente com LPS (10  $\mu$ g/mL) por 45 min. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares. \*\*\* significativamente diferente da própolis e do LPS ( $p < 0,0001$ ).

Além de avaliar via de sinalização do NF- $\kappa$ B, avaliamos também alguns miRNAs que poderiam regular a função das DCs. Conforme observado na figura 4, o tratamento de DCs com própolis diminuiu a expressão de hsa-miR-148a e hsa-miR-148b ( $p < 0,01$ , utilizando 5 e 20  $\mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0,001$ , utilizando 40  $\mu\text{g/mL}$ ).

Com relação ao miRNA-155, o produto apícola estimulou significativamente sua expressão ( $p < 0,01$ ), utilizando 40  $\mu\text{g/mL}$ .

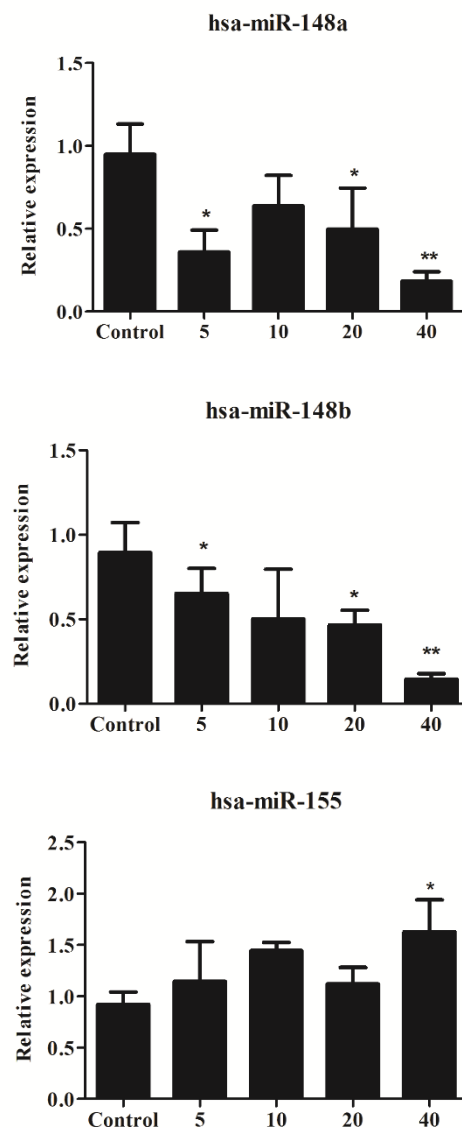


Figura 4. Expressão relativa de hsa-miR-148a, hsa-miR-148b e hsa-miR-155 por células dendríticas humanas incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20, 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 12 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares, utilizando valores normalizados (\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$  vs controle).

Um dos miRNAs mais caracterizados em DCs é o miR-155, cuja expressão está aumentada durante a maturação destas células em resposta aos ligantes de TLRs, TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ , tanto em camundongos como em humanos. Várias evidências indicam que o miR-155 exerce um papel predominantemente pró-inflamatório, associado à produção aumentada de TNF- $\alpha$ . SHIP1 (*Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1*) é um dos alvos diretos do miR-155 e, enquanto a atividade da SHIP1 está relacionada à redução na produção de citocinas inflamatórias em vários tipos celulares, como macrófagos e DCs, sua expressão diminui em resposta ao TNF- $\alpha$ . A super-expressão de miR-155 culmina em repressão da SHIP1 e subsequente ativação de Akt, o qual é requerido para ativação de DCs. O miR-155, associado à ativação de Akt, pode estar relacionado ao perfil pró-inflamatório deste miRNA em DCs. A estabilização dos transcritos de TNF- $\alpha$  bem como a SHIP1 como alvo direto exemplificam como um único miRNA pode agir em diferentes alvos, resultando na regulação das funções celulares (BUSCH & ZERNECKE, 2012).

Compostos polifenólicos oriundos de diversas fontes, como por exemplo a própolis, podem regular a expressão gênica, através da regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs. Nas últimas décadas, o conhecimento sobre o controle transcricional exercido pelos miRNAs e sua capacidade moduladora aumentou consideravelmente (CUEVAS *et al.*, 2014).

A expressão dos membros da família hsa-miR-148 (hsa-miR-148a, hsa-miR-148b e miR-152) está aumentada após estímulo das DCs humanas com LPS, com consequente diminuição da expressão de MHC-II, inibição de algumas citocinas pró-inflamatórias e redução da expansão de células T CD4<sup>+</sup> mediadas por DCs. Tal efeito inibitório é devido ao alvo de hsa-miR-148/152 – a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II (CaMKII), a qual é um importante regulador da maturação e função das DCs. A inibição da CaMKII em DCs resulta em redução da expressão de MHC induzida por antígeno, secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$  (LIU *et al.*, 2010).

De acordo com ELTON *et al.* (2013), a expressão de miR-155, miR-146a, e miR-21 pode ser induzida em resposta à sinalização mediada por TLR-4 em monócitos. O miRNA-155 pode exercer inúmeros papéis, atuando na diferenciação de DCs, bem como de linfócitos T *helper*, linfócitos B e produção de anticorpos. Uma ampla gama de alvos pode ser regulada pelo miR-155, como mRNAs para citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição. Em macrófagos, a expressão de miR-155 encontra-se elevada durante a resposta inflamatória, e em DCs, este microRNA, juntamente com miR-221 regula o desenvolvimento celular, apoptose e produção de IL-12 (DUECK *et al.*, 2014).

Avaliando a expressão de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo, observa-se que a própolis manteve a expressão de TLR-4 induzida por LPS, estando elevada somente na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ , mesmo assim não chegando a 5% ( $p<0.01$ ). A própolis também manteve a ativação induzida pelo LPS de HLA-DR e CD40 nestas células. No tocante ao CD86, o tratamento com a própolis nas concentrações mais elevadas aumentou significativamente sua expressão ( $p<0.01$ ). Por outro lado, a expressão de CD80 por DCs foi inibida significativamente ( $p<0.001$ ) após incubação com própolis na concentração de 40  $\mu\text{g}$  (figura 5). Assim, pode-se correlacionar o aumento na expressão de hsa-miR-155 induzido pela própolis com o aumento na expressão de TLR-4, CD86 e expressão inalterada de CD40.

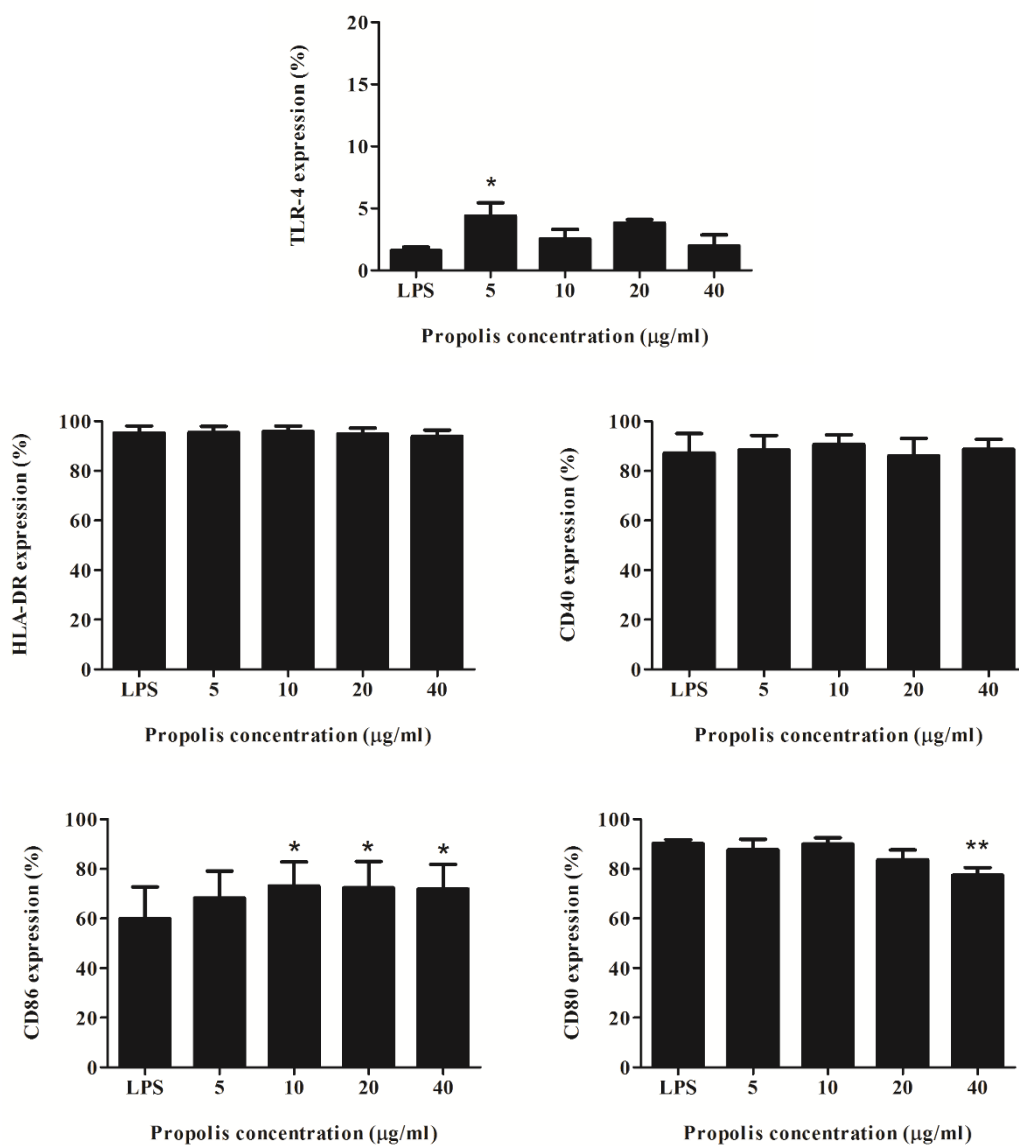


Figura 5. Expressão de TLR-4, HLA-DR, CD40, CD86 e CD80 em porcentagem (%) por células dendríticas humanas incubadas com diferentes concentrações de própolis/LPS (5, 10, 20, 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e somente LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares (\* $p<0.01$ ; \*\* $p<0.001$  vs LPS).

Em camundongos, a própolis modula os eventos iniciais da resposta imune, induzindo a expressão de TLR-2 e TLR-4 e produção de citocinas pró-inflamatórias (ORSATTI *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, a própolis induziu aumento na expressão de TLR-4 e CD86 em DCs humanas, e inibiu a expressão de CD80, mantendo a ativação induzida pelo LPS de HLA-DR e CD40. O aumento na expressão de TLR-4 e CD86 pode favorecer o reconhecimento de antígenos por DCs e a conseqüente ativação da célula T. CD80 desempenha papel importante na resposta imunológica, atuando como molécula co-estimulatória para a ativação das células T, mas CD86 também desempenha funções semelhantes e sua expressão esteve aumentada após incubação de DCs com quase todas as concentrações de própolis. Assim, pode-se especular que a função desempenhada por CD80 possa ser compensada pelo aumento induzido na expressão de CD86, culminando no evento biológico desejado, que é a ativação da célula T.

WANG *et al.* (2009) avaliaram o efeito do éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) isolado da própolis na maturação de DCs humanas *in vitro*, demonstrando que o tratamento com CAPE manteve a expressão de HLA-DR, CD86, e CD83 induzida pelo LPS. Estes dados sugerem que, em nosso projeto, possivelmente outro(s) componente(s) da própolis deve(m) estar envolvido(s) no aumento da expressão de TLR-4 e CD86.

VISINTIN *et al.* (2001) relataram que o TLR-4 é expresso em maior proporção em monócitos do que em DCs imaturas, que estão entrando em contato com o antígeno. De fato, BÚFALO *et al.* (2014) observaram que a própolis induziu aumento expressivo na expressão de TLR-4 em monócitos humanos após 18 h de incubação, a qual era da ordem de 20% nas células sem estímulo algum. Ademais, estes autores observaram aumento na expressão de CD80, bem como na produção de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10) e na atividade fungicida destas células, dependendo da concentração.

VISINTIN *et al.* (2001) relataram que a expressão de TLR-4 aumentou transitoriamente quando DCs foram incubadas com LPS para o processo de maturação, diminuindo significativamente logo em seguida. Embora a própolis tenha induzido aumento significativo na expressão de TLR-4 por DCs, a expressão deste receptor foi baixa e menor em relação aos demais marcadores. Ainda assim, este aumento pode ter implicações biológicas, favorecendo o reconhecimento de antígenos por DCs.

Avaliando o efeito de outro produto natural (*Panax ginseng*) nos eventos iniciais da resposta imune, PANNACCI *et al.* (2006) administraram oralmente 25 mg/kg/dia do extrato desta planta a camundongos, verificando aumento significativo de TLR-4 por macrófagos e sugerindo que este extrato estimula gradualmente estas células. Os autores também sugeriram

que ginsenosídeos, ou outros componentes ativos do ginseng, poderiam atuar como agonista do TLR-4.

KWON *et al.* (2011) investigaram o efeito do extrato da canela (*Cinnamomum cassia*) sobre o estado de maturação da linhagem de macrófagos murinos Raw 264.7, avaliando níveis de expressão de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (B7-1 e B7-2), e investigando a modulação da apresentação de antígenos. Além de observarem efeito inibitório do extrato na expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), as moléculas de superfície também foram inibidas significativamente, sugerindo que este extrato exerce ação inibitória sobre a ativação e maturação destas células *in vitro*.

Assim, observa-se que diferentes produtos naturais podem modular diferentemente a expressão de marcadores de superfície em diferentes células envolvidas na resposta imune.

Produtos naturais, como a própolis, podem modular a produção de citocinas na imunidade inata ou adaptativa. Um dos fatores preponderantes no desenvolvimento da resposta imune é o microambiente em que ela se inicia. Diferentes citocinas presentes no momento da apresentação de antígeno podem induzir a geração de subtipos de linfócitos T capazes de respostas efectoras distintas, sendo a IL-12 importante para diferenciação de linfócitos T em células Th1 e a IL-4 um fator preponderante para a geração de células Th2 (BETTELLI *et al.*, 2006; HARRINGTON *et al.*, 2006). Dando continuidade a nossos ensaios, realizamos a análise da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12 pelas DCs.

Citocinas como o TNF- $\alpha$  são importantes no processo de ativação de monócitos e macrófagos, enquanto que outras citocinas, como a IL-10, são consideradas fatores de desativação celular. TNF- $\alpha$  é considerado uma citocina multifuncional, sendo um dos mediadores inflamatórios mais importantes. O TNF- $\alpha$  exerce funções diversas como indução da produção de outras citocinas e quimiocinas pelas células do sistema imunológico, além de induzir a expressão de moléculas de adesão e o aumento da permeabilidade no endotélio, o que propicia o aumento do número de células mononucleares no local da inflamação (HEHLGANS *et al.*, 2005).

No tocante ao TNF- $\alpha$ , DCs incubadas com própolis apresentaram maior produção desta citocina em relação ao controle, não afetando o perfil ativador do LPS (figura 6). Esse achado está correlacionado ao fato de a própolis manter o perfil ativador do LPS com relação à via de ativação intracelular do NF-kB, o qual também está relacionado com a expressão gênica de IL-6 (LIBERMANN & BALTIMORE, 1990).

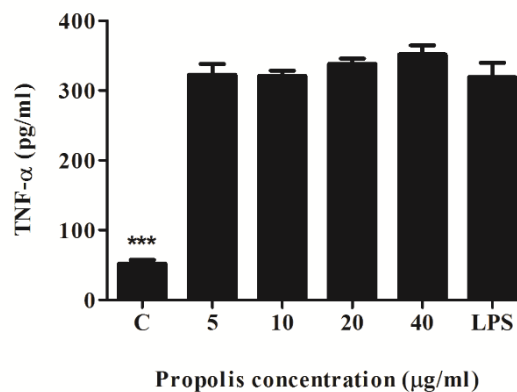


Figura 6. Produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) por células dendríticas controle (C) ou incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20 e 40  $\mu$ g/mL) e LPS (10  $\mu$ g/mL) por 24 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares. \*\*\* significativamente diferente da própolis e do LPS ( $p < 0,0001$ ).

O TNF- $\alpha$  pode induzir a produção de outras citocinas e quimiocinas pelas células do sistema imunológico, podendo induzir, também, a expressão e moléculas de adesão e o aumento da permeabilidade do endotélio, propiciando maior concentração de células mononucleares no local onde acontece a inflamação (HEHLGANS *et al.*, 2005). O TNF- $\alpha$  induz a produção de IL-10 por monócitos humanos, enquanto esta citocina anti-inflamatória é capaz de exercer um *feedback* negativo para a produção do fator de necrose tumoral (WANIDWORANUN & STROBER, 1993). Porém, ainda não está claro se estímulos diferentes agem diretamente na produção de citocinas reguladoras ou efetoras, ou se esses variados estímulos desencadeiam a produção concomitante das diferentes citocinas, com cinéticas diferentes.

A IL-6 atua tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa. Na imunidade inata, atua como estímulo para a produção de neutrófilos e síntese de proteínas de fase aguda; já na imunidade adaptativa, atua na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (YOON *et al.*, 2009). A produção de IL-6 pode ser estimulada por citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e tem sido cada vez maior o número de trabalhos que demonstram a ambigüidade da IL-6, por possuir tanto efeitos anti-inflamatórios quanto pró-inflamatórios.

A produção de IL-6 por DCs estimulada pela própolis apresentou-se elevada em relação ao controle ( $p < 0,01$ ) (figura 7). A concentração aumentada de IL-6 pode estar relacionada com a regulação da produção de TNF- $\alpha$ .

Em nosso trabalho, DCs tratadas com própolis apresentaram inibição na expressão de hsa-miR-148a e hsa-miR-148b. Uma vez que a família do hsa-miR-148/152 pode estar envolvida na inibição da expressão de MHC-II mediada por sinais via TLR, bem como na

produção reduzida de citocinas pró-inflamatórias por DCs (LIU *et al.*, 2010), nossos dados revelam que o tratamento com própolis aboliu este efeito inibitório, pois houve expressão normal de HLA-DR e aumento na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em relação ao controle.

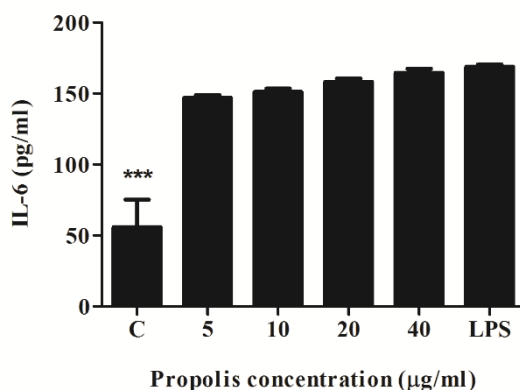


Figura 7. Produção de IL-6 (pg/mL) por células dendríticas controle (C) ou incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20 e 40 µg/mL) e LPS (10 µg/mL) por 24 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares. \*\*\* significativamente diferente do LPS ( $p < 0,0001$ ).

As três menores concentrações de própolis induziram maior produção de IL-10 (figura 8), mesmo em presença de LPS, o que pode ter sido desencadeado pelo aumento de TNF- $\alpha$  produzido pelas DCs, induzindo a expressão do mRNA para IL-10 (PLATZER *et al.*, 1995).

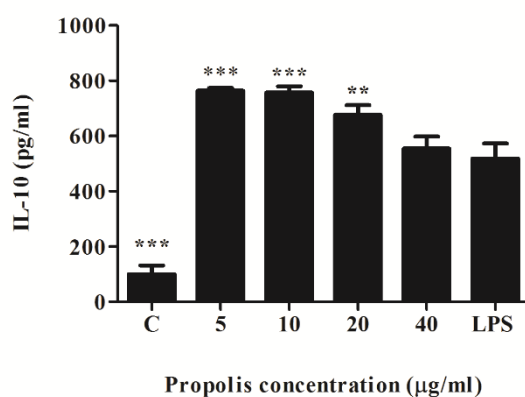


Figura 8. Produção de IL-10 (pg/mL) por células dendríticas controle (C) ou incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20 e 40 µg/mL) e LPS (10 µg/mL) por 24 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares. Significativamente diferente do LPS \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

A IL-12 é uma citocina com importante função no início e regulação da resposta imune celular. A IL-12 é uma citocina heterodimérica formada por duas cadeias, a IL-12p35 e a IL-12p40, sendo que a subunidade IL-12p40 também é comum à IL-23, formando um heterodímero com a cadeia IL-23p19, sendo ambas as citocinas IL-12 e IL-23 produzidas por APCs ativadas (OPPMANN *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2004). Esta citocina possui a capacidade de promover a diferenciação de células T *naïve* em Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , as quais são fundamentais para o desenvolvimento da imunidade celular e resistência contra patógenos intracelulares (ALBER *et al.*, 2006). A IL-12 estimula também a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e linfócitos T.

Conforme observado na figura 9, as menores concentrações de própolis mantiveram a produção de IL-12 induzida por LPS, enquanto concentrações mais elevadas inibiram a produção desta citocina ( $p < 0,001$ , utilizando 10  $\mu\text{g}$ ;  $p < 0,0001$ , utilizando 20  $\mu\text{g}$ ).

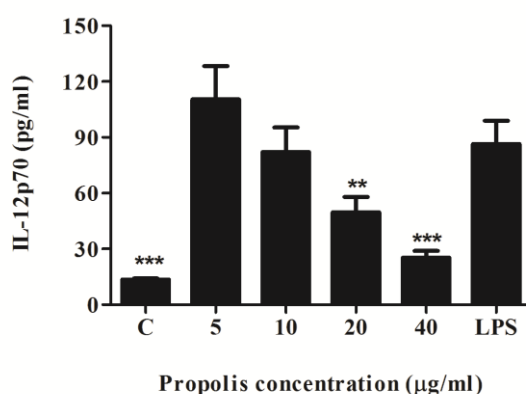


Figura 9. Produção de IL-12p70 (pg/mL) por células dendríticas controle (C) ou incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares. \*\*Significativamente diferente do LPS ( $p < 0,001$ ), \*\*\*( $p < 0,0001$ ).

A IL-12 pode promover a diferenciação de células T *naïve* em Th1, favorecendo a resposta imune celular. Visto que a própolis inibiu a produção desta citocina em DCs, pode-se especular que o tratamento das células com este apiterápico possa culminar em ativação preferencial do perfil Th2 e favorecimento da resposta humoral. De fato, inúmeras evidências têm relatado a maior produção de anticorpos por animais tratados com própolis. SCHELLER *et al.* (1988) verificaram que o extrato etanólico de própolis estimula a formação de anticorpos por camundongos BALB/c imunizados com hemácias de carneiro, sugerindo a associação desta atividade imunoestimulante com a ativação de macrófagos, a qual levaria à produção de citocinas, regulando assim as funções das células B e T. Em trabalho de nosso grupo,

verificamos que a administração de própolis a ratos aumentou o título de anticorpos anti-albumina sérica bovina (BSA) após 15 dias da imunização (SFORCIN *et al.*, 2005). CHU (2006) também observou que peixes que receberam vacina inativada contra *Aeromonas hydrophila* acrescida de própolis apresentaram títulos de anticorpos significativamente mais elevados em relação ao grupo que recebeu somente a vacina, em todos os períodos de tempo avaliados, bem como atividade fagocítica mais elevada. Este autor mencionou que a própolis poderia ativar células apresentadoras de antígeno, estimulando-as a produzir citocinas ativadoras de linfócitos T e B, sugerindo sua possível utilização como adjuvante nas vacinas. A habilidade da própolis em modular a síntese de anticorpos é parte de sua atividade adjuvante, uma vez que este produto apícola apresenta potente efeito sobre diferentes células da resposta imune inata, conforme observado em nossos trabalhos e no de outros autores.

DCs podem desempenhar inúmeras funções importantes, e neste projeto avaliamos a ação moduladora da própolis sobre a atividade bactericida contra *Streptococcus mutans*, a qual apresentou-se aumentada significativamente após incubação das DCs com própolis ( $p < 0.001$ , utilizando 10 e 20  $\mu\text{g}$ ;  $p < 0.0001$ , utilizando 40  $\mu\text{g}$ ) (figura 10).

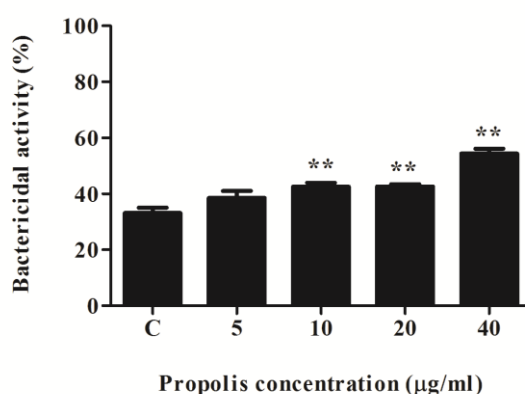


Figura 10. Atividade bactericida (%) de células dendríticas humanas incubadas com diferentes concentrações de própolis (5, 10, 20, 40  $\mu\text{g/mL}$ ) e LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ), e desafiadas com *Streptococcus mutans* (proporção DCs/bactéria = 1:5) por 2 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 ensaios similares (\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$  vs controle - C).

Trabalhos anteriores do nosso grupo revelaram que a própolis aumenta a atividade bactericida de macrófagos peritoneais de camundongos contra *Salmonella Typhimurium* (ORSI *et al.*, 2005) e a atividade fungicida destas mesmas células contra *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD *et al.*, 2002). Recentemente, em estudos com monócitos humanos, verificamos que a incubação com própolis, ácido cinâmico ou cafeico aumentou a atividade fungicida destas células contra *Candida albicans*, porém em concentrações mais elevadas (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) que

as utilizadas no presente trabalho (CONTI *et al.*, 2013; BÚFALO *et al.*, 2014). Contudo, não há dados na literatura pertinente sobre a ação própolis em DCs humanas, o que demonstra o caráter inédito de nossa pesquisa.

Embora os dados obtidos não permitam indicar os possíveis mecanismos pelos quais a própolis induz aumento na atividade microbicida por DCs, pode-se especular que a atividade bactericida após incubação com a própolis possa envolver mecanismos efetores como, por exemplo, a produção de metabólitos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por DCs quando em contato com as bactérias, bem como mecanismos não oxidativos, como aumento na produção de enzimas lisossomais.

Tomados em conjunto, os dados sugerem o perfil ativador da própolis em DCs, visto que este produto apícola induziu a via de ativação intracelular do NF-κB e a produção de TNF-α, IL-6 e IL-10. Ademais, a inibição na expressão de hsa-miR-148a e hsa-miR-148b aboliu o efeito inibitório dos mesmos sobre a expressão de HLA-DR e também pode ter favorecido a produção de citocinas pró-inflamatórias. O aumento na expressão de hsa-miR-155 pode estar correlacionado ao aumento na expressão de TLR-4 e CD86, além de manter a ativação induzida pelo LPS de HLA-DR II e CD40. Estes parâmetros podem estar envolvidos com o aumento na atividade bactericida de DCs contra *Streptococcus mutans*.

## *Conclusões*

## 5. Conclusões

- ✓ A própolis afetou a maturação das DCs, mantendo a ação induzida por LPS tanto na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B como na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, o que sugere perfil ativador sobre DCs humanas, sem comprometer a viabilidade das mesmas.
- ✓ A própolis induziu aumento na expressão de TLR-4 e CD86 em DCs, podendo favorecer o reconhecimento de antígenos e a conseqüente ativação da célula T. Embora tenha havido inibição na expressão de CD80 após incubação com própolis, este achado pode não ter implicações importantes, pois CD86 também desempenha funções semelhantes e sua expressão esteve aumentada após incubação de DCs com própolis. Assim, pode-se especular que a função desempenhada por CD80 possa ser compensada pelo aumento induzido na expressão de CD86, culminando no evento biológico desejado, que é a ativação da célula T.
- ✓ O tratamento de DCs com própolis inibiu a expressão de hsa-miR-148a e hsa-miR-148b, abolindo conseqüentemente o efeito inibitório dos mesmos sobre a expressão de HLA-DR e produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6).
- ✓ O aumento na expressão de hsa-miR-155 induzido pela própolis pode estar relacionado ao aumento na expressão de TLR-4, CD86 e com a expressão inalterada de CD40 em DCs.
- ✓ Considerando a relação do hsa-miR-155 com o comprometimento de resposta aos patógenos, pode-se especular que este aumento possa estar correlacionado com a atividade bactericida aumentada após incubação de DCs com própolis.
- ✓ Nossos dados sugerem que a própolis pode modular positivamente a maturação e função de DCs, nas condições deste ensaio.

# *Referências Bibliográficas*

## 6. Referências Bibliográficas

- ALBER, G., AL-ROBAIY, S., KLEINSCHKE, M., KNAUER, J., KRUMBHOLZ, P., RICHER, J., SCHOENEBERGER, S., SCHUETZE, N., SCHULZ, S., TOEFER, K., VOIGLAENDER, R., LEHMANN, J., MUELLER, U. Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. S441-5, 2006.
- ANGLICHEAU, D., SHARMA, V. K., DING, R., HUMMEL, A., SNOBKOWSKI, C., DADHANIA, D., MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. **Proceeding of National Academy of Sciences USA**, v. 106, p. 5330-5335, 2009.
- ANSORGE, S., REINHOLD, D., LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- $\beta$ 1 production of human immune cells. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p. 580-9, 2003.
- AUFFRAY C, SIEWEKE MH, GEISSMANN F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 669-92. 2009
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B., PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-52, 1998.
- BANNWART, C. F., NAKAIRA-TAKAHAGI, E., GOLIM, M. A., DE MEDEIROS, L. T., ROMÃO, M., WEEL, I. C., PERAÇOLI, M. T. Downregulation of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) pathway by silibinin in human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Life Sciences*. v. 86, p. 800-886, 2010.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, p. 215-33, 2009.

---

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

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

- BASTOS, K. R., MARINHO, C. R., BARBOZA, R., RUSSO, M., ALVAREZ, J. M., D'IMPÉRIO, LIMA, M. R. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cell? **Microbes and Infection**, v. 6, p. 630-6, 2004.
- BECKER, C., HAMMERLE-FICKINGER, A., RIEDMAIER, I., PFAFFL, M. W. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, v. 50, p. 237-43. 2010.
- BETTELLI, E., CARRIER, Y., GAO, W., KORN, T., STROM, T.B., OUKKA, M., WEINER, H.L., KUCHROO, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, p. 235-8, 2006.
- BRIGL, M., BRENNER, M. B. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 817-890, 2004.
- BÚFALO, M.C., GRACIANI, A.P.B., CONTI, B.J., GOLIM, M.A., SFORCIN, J.M. The immunomodulatory effect of propolis and caffeic acid on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1497-1504, 2014.
- BUSCH, M. & ZERNECKE, A. microRNAs in the regulation of dendritic cell functions in inflammation and atherosclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, p. 877–85, 2012.
- BYKOVSKAIA, S. N., SHURIN, G. V., GRANER, S., BUNKER, M. L., OLSON, W., THOMAS, R., SHURIN, M. R., MARKS, S., STORKUS, W. J., SHOGAN, J. Differentiation of immunostimulatory stem-cell- and monocyte-derived dendritic cells involves maturation of intracellular compartments responsible for antigen presentation and secretion. **Stem Cells**, v. 20, p. 380-93, 2002.
- CALAME, K., MicroRNA-155 function in B cells. **Immunity**, v. 27, p. 825-827, 2007
- CELLA, M., ENGERING, A., PINET, V., PIETERS, J., LANZAVECCHIA, A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, v. 388, p. 782-787, 1997.
- CHANG F., LEE JT., NAVOLANIC PM., STEELMAN LS., SHELTON JG., BLALOCK WL., Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 17, p. 590-603, 2003.
- CHU, W.H. Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, p. 113-7, 2006.
- CONTI, B. J., BÚFALO, M. C., GOLIM, M. A., BANKOVA, V., SFORCIN, J. M. Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-8, 2013.

- CONTI, L., CARDONE, M., VARANO, B., PUDDU, P., BELARDELLI, F., GESSANI, S.  
Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 750-762, 2008.
- CUEVAS, A., SAAVEDRA, N., CAVALCANTE, M.F., SALAZAR, L.A., ABDALLA, D.S.P. Identification of microRNAs involved in the modulation of pro-angiogenic factors in atherosclerosis by a polyphenol-rich extract from propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 557, p. 28-35, 2014.
- DE JONG, E.C., SITS, H.H., KAPSENBERG, M.L., Dendritic cell-mediated T cell polarization. **Seminars in Immunopathology**, v. 26, p. 289-307, 2005.
- DOLCET, X., LIOBET, D., PALLARES, J., MATIAS-GUIU, X. NF- $\kappa$ B in development and progress of human cancer. **Virchows Archiv: an International Journal of Pathology**, v. 446, p. 475-82, 2005.
- DUECK, A., EICHNER, A., SIXT, M., MEISTER, G. A miR-155-dependent microRNA hierarchy in dendritic cell maturation and macrophage activation. **FEBS Letters**, v. 588, p. 632-40, 2014.
- DUNAND-SAUTHIER, I., SANTIAGO-RABER, M. L., CAPPONI, L., VEJNAR, C. E., SCHAAD, O., IRLA, M., SEGUIN-ESTEVEZ, Q., DESCOMBES, P., ZDOBNOV, E. M., ACHA-ORBEA, H., REITH, W., Silencing of c-Fos expression. By microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. **Blood**, v. 117, p. 4490-4500, 2011.
- ELKORD, E., WILLIAMS, P. E., KYNASTON, H., ROWBOTTOM, A. W. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. **Immunology**, v. 114, p. 204-212, 2005.
- ELTON, T.S., SELEMON, H., ELTON, S.M., PARINANDI, N.L. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. **Gene**, v. 532, p. 1-12, 2013.
- FISCHER, G., CONCEIÇÃO, F.R., LEITE, F.P., DUMMER, L.A., VARGAS, G.A., HUBNER, S.O., DELLAGOSTIN, O.A., PAULINO, N., PAULINO, A.S., VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, p. 1250-6, 2007.
- FLEIGE, S. & PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p. 126-39 2006.
- FONTANA, L., E. PELOSI, P. GRECO, S. RACANICCHI, U. TESTA, F. LIUZZI, C. M. CROCE, E. BRUNETTI, F. GRIGNANI, AND C. PESCHLE. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. **Nature Cell Biology**, v. 9, p. 775-787, 2007.

- FRLETA, D., LIN, J. T., QUEZADA, S. A., WADE, T. K., BARTH, R. J., NOELLE, R. J., WADE, W. F. Distinctive maturation of *in vitro* versus *in vivo* anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice. **Journal of Immunotherapy**, v. 26, p. 72-84, 2003.
- FURGIERVIVIER, I., SERVET-DELPAT, C., RIVAILLER, P., RISSOAN M. C., LIU Y. J., RABOURDIN-COMBE, C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic cells and T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, p. 813-23, 1997.
- GANGARAJU, V.K., LIN, H. MicroRNAs: Key regulators of stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 116-125, 2009.
- GATTI, E., VELLECA, M.A., BIEDERMANN, B.C., MA, W., UNTERNAEHRER, J., EBERSOLD, M.W., MEDZHITOV, R., POBER, J.S., MELLMAN, I. Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factor mobilized CD34 progenitors. **Journal of Immunology**, v.164, p.600-607, 2000.
- GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M., LEY, K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656-61, 2010.
- HARRINGTON, L.E., HATTON, R.D., MANGAN, P.R., TURNER, H., MURPHY, T.L., MURPHY, K.M., WEAVER, C.T. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 11, p. 1123-32, 2006.
- HARRIS, A., KRAMS, S. M., MARTINEZ, O. M., MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 10, p. 713-719, 2010.
- HARTONO, C., MUTHUKUMAR, T., SUTHANTHIRAN, M. Noninvasive diagnosis of acute rejection of renal allografts. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 15, p. 35-41, 2010.
- HEHLGANS, T., PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, p. 1-20, 2005.
- HERRMANN, T. L., C. T. MORITA, K. LEE, D. J. KUSNER. . Calmodulin kinase II regulates the maturation and antigen presentation of human dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 1397–1407, 2005.

- INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S., STEINMAN, R.M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, p. 1693-702, 1992.
- JANEWAY, C. A. Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, v. 19, p. 7461-8, 2001.
- JOFFRE, O., NOLTE, M.A., SPÖRRI, R., REIS SOUSA, C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunology Review*. v. 227, p. 234-247, 2009.
- JOHNNIDIS, J. B., M. H. HARRIS, R. T. WHEELER, S. STEHLING-SUN, M. H. LAM, O. KIRAK, T. R. BRUMMELKAMP, M. D. FLEMING, AND F. D. CAMARGO. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by micro-RNA-223. **Nature**, v. 451, p.1125–1129, 2008.
- KIM, M. & JOO, H. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. **Immunology Letters**, v.115, p. 138-43, 2008.
- KONG, Y.H., JO, Y.O., CHO, C.W., SON, D., PARK, S., RHO, J., CHOI, S.Y. Inhibitory effects of cinnamic acid on melanin biosynthesis in skin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 946-8, 2008.
- KVISTBORG, P., BOEGH, M., PEDERSEN, A. W., CLAEISSON, M. H., ZOCCA M. B. Fast generation of dendritic cells. **Cell Immunology**. v. 260, p. 56-62, 2009.
- KWON, H.K., HWANG, J.S., LEE, C.G., SO, J.S., SAHOO, A., IM, C.R., JEON, W.K., KO, B.S., LEE, S.H., PARK, Z.Y., IM, S.H. Cinnamon extract suppresses experimental colitis through modulation of antigen-presenting cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, p.976-986, 2011.
- LIBERMANN, T.A., BALTIMORE, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-KB transcription factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, p. 2327-34, 1990.
- LI, J. Y., YONG, T. Y., MICHAEL, M. Z., GLEADLE, J. M. Review: The role of microRNAs in kidney disease. **Nephrology (Carlton)**. v. 15, p. 599-608, 2010.
- LI, Q. J., CHAU, J., EBERT, P. J., SYLVESTER, G., MIN, H., LIU, G., BRAICH, R., MANOHARAN, M., SOUTSCHEK, J., SKARE, P. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. **Cell**, v.129, p.147–161, 2007.
- LIU, X. Z., ZHAN, L., XU, F., MA, D., LI, Z., GUO, N., LI, X. MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKII $\alpha$ . **Journal of Immunology**, v. 185, p.7244–7251, 2010.

- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)). *Method. Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MacDONALD, K.P.A., MUNSTER, D.J., CLARK, G.J., DZIOBEK, A., SCHMITZ, J., HART, D.N.J. Characterization of human blood dendritic cells subsets. *Blood*, v. 100, p. 4512-20, 2002.
- MANI, F.; DAMASCENO, H. C. R.; NOVELLI, E. L. B.; MARTINS, E. A.; SFORCIN, J. M. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology*. v.105, p. 95-8, 2006.
- MAO, C. P., HE, L., TSAI, Y. C., PENG, S., KANG, T.H., PANG, X., MONIE, A., HUNG, C. F., WU, T. C. In vivo microRNA-155 expression influences antigen-specific T cell-mediated immune responses generated by DNA vaccination. *Cell & Bioscience*, v. 18, p. 1-3, 2011.
- MARKOWICZ, S. & ENGLEMAN, E. G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, v. 85, p.955-961, 1990.
- MCCARTHY, N. Cancer: small losses, big gains with microRNAs. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, p. 8, 2010.
- MURAD, J.M., CALVI, S.A., SOARES, A.M.V.C., BANKOVA, V., SFORCIN, J.M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 331-4, 2002.
- NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; GOLIM, M. A.; BANNWART, C. F.; PUCCIA, R.; PERAÇOLI, M. T. Interactions between TLR2, TLR4 and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Medical Mycology*, v. 49, p. 694-703, 2011.
- O'CONNELL, R. M., TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHENG, G., BALTIMORE, D., MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, v. 104, p. 1604-1609, 2007.
- OPPMANN, B., BLOM, B, TIMANS, JC, XU, Y, HUNTE, B, VEGA, F, YU, N, WANG, J, SIGNH, K, ZONIN, F, VAISBERG, E, CHURAKOVA, T, LIU, M, GORMAN, D, WAGNER, J, ZURAWSKI, S, LIU, Y, ABRAMS, JS, MOORE, KW, RENNICK, D, HANNUM, C, BAZAN, JF, KASTELEIN, RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, v. 13, p. 715-25, 2000.

- ORSATTI, C.L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., BACHIEGA, T.F., BÚFALO, M.C., ARAÚJO JR., J.P., SFORCIN, J.M. Propolis immunomodulatory action *in vivo* on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1141-6, 2010.
- ORSI, R.O., FUNARI, S.R.C., SOARES, A.M.V.C., CALVI, S.A., OLIVEIRA, S.L., SFORCIN, J.M., BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, p. 205-19, 2000.
- ORSI, R.O., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C., BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella* Typhimurium. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 359-68, 2005.
- ORSOLIC, N., SARANOVIC, A.B., BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Medica**, v. 72, p. 20-7, 2006.
- PANNACCI, M., LUCINI, V., COLLEONI, F., MARTUCCI, C., GROSSO, S., SACERDOTE, P., SCAGLIONE, F. *Panax ginseng* C.A. Mayer G115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage toll-like receptor 4 expression during physical stress. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 20, p.546-51, 2006.
- PEREIRA, S. R., FACA, V. M., GOMES, G. G., CHAMMAS, R., FONTES A. M., COVAS, D. T. Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide. **Proteomics**. v. 5, p. 1186-1198, 2005.
- PLATZER, C., MEISEL, C., VOGT, K., PLATZER, M., VOLK, H.D. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- $\alpha$  and cAMP elevating drugs. **International Immunology**, v. 7, p. 517-23, 1995.
- POLANCEC, D. S., MUNIC, K. O. S., V, BANJANAC, M., VRANCIC, M., CUZIC, S., BELAMARIC, D., PARNHAM, M. J., POLANCEC, D., ERAKOVIC HABER, V. Azithromycin drives *in vitro* GM-CSF/IL-4-induced differentiation of human blood monocytes toward dendritic-like cells with regulatory properties. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, p.229-43, 2012.
- RODRIGUEZ, A., VIGORITO, E., CLARE, S., WARREN, M. V., COUTTET, P., SOOND, D. R., VAN, DONGEN, S., GROCOCK, R. J., DAS, P. P., MISKA, E. A., VETRIE, D., OKKENHAUG, K., ENRIGHT, A. J., DOUGAN, G., TURNER, M., BRADLEY, A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. **Science**, v. 316, p. 608–611, 2007.

- ROSSI, M., YOUNG, J.W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Journal of Immunology**, v.175, p.1373-1381, 2005.
- SALATINO, A., TEIXEIRA, E.W., NEGRI, G., MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-38, 2005.
- SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A., Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, p. 1109-18, 1994.
- SÁ-NUNES, A., FACCIOLI, L.H., SFORCIN, J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 93-7, 2003.
- SARMA, N. J., TIRIVEEDHI, V., RAMACHANDRAN, S., CRIPPIN, J., CHAPMAN, W., MOHANAKUMAR, T., Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 93, p. 378-385, 2012.
- SCHELLER, S., GAZDA, G., PIETSZ, G., GABRYS, J., SZUMLAS, J., ECKERT, L., SHANI, J. The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. **Pharmacological Research Communications**, v. 20, p. 323-8, 1988.
- SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.
- SFORCIN, J.M., BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253-60, 2011.
- SFORCIN, J.M., FERNANDES JR., A., LOPES, C.A.M., FUNARI, S.R.C., BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, p. 139-44, 2001.
- SFORCIN, J.M., FERNANDES JR, A., LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-9, 2000.
- SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C., NOVELLI, E.L.B. Serum biochemical determinations of propolis-treated rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 1, p. 31-7, 1995.
- SFORCIN, J.M., KANENO, R., FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 19-29, 2002.

- SFORCIN, J.M., ORSI, R.O., BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-5, 2005.
- SHEEDY, F.J., PALSSON-MCDERMOTT, E., HENNESSY, E.J., MARTIN, C., O'LEARY, J.J., RUAN, Q., JOHNSON, D.S., CHEN, Y., O'NEILL, L.A. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. **Nature Immunology**, v. 11, p.141–147, 2010.
- SHORTMAN, K. & NAIK, S.H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nature Review Immunology**, v. 3, p. 151-61, 2002.
- STEINMAN, R.M. & COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantification, tissue distribution. **Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 1142-62, 1973.
- SZABOLCS, P., AVIGAN, D., GEZELTER, S., CIOCON, D.H., MOORE, M.A.S., STEINMAN, R.M., YOUNG, J.W. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-CFU intermediate. **Blood**, v.87, p.4520-4530, 1996.
- TAGANOV, K. D., M. P. BOLDIN, K. J. CHANG, AND D. BALTIMORE. NF-kappa B dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceeding of National Academy of Sciences USA**. v.103, p.12481– 12486, 2006.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, p. 1-14, 2005.
- TAN, E.L., SELVARATNAM, G., KANANATHAN, R., SAM, C.K. Quantification of Epstein-Barr virus DNA load, interleukin-6, interleukin-10, transforming growth factor- $\beta$ 1 and stem cell factor in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. **BMC Cancer**, v. 6, p. 227, 2006.
- THAI, T. H., CALADO, D. P., CASLLA, S., ANSEL, K. M., XIAO, C., XUE, Y. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. **Science**, v. 316, p. 604-608, 2007
- VISINTIN, A., MAZZONI, A., SPITZER, J.H., WYLLIE, D.H., DOWER, S.K., SEGAL, D.M. Regulation of Toll-Like receptors in human monocytes and dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.166, p.249-255, 2001.
- WANG, L.C., LIN, Y.L., LIANG, Y.C., YANG, Y.H., LEE, J.H., YU, H.H., WU, W.M., CHIANG, B.L. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. **BMC Immunology**, v. 10, p. 39-51, 2009.
- WANIDWORANUN, C. & STROBER, W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 6853-61, 1993.

- WATANABE, M.A.E., AMARANTE, M.K., CONTI, B.J., SFORCIN, J.M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anti-cancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1378-86, 2011.
- WESA, A., GALY, A. Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand. **BMC Immunology**, v. 3, p. 1-14, 2002.
- WU, L., LIU, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. **Immunity**. v. 26, p. 741-750, 2007.
- YOON, S. B, LEE, Y. J., PARK, S. K., KIM, H. C., BAE, H., KIM, H. M., KO, S. G., CHOI, Y., OH, M. S., PARK, W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extrat on LPS- activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 286-90, 2009.

*Manuscrito*

## Propolis influences the maturation and function of human dendritic cells

Bruno J. Conti<sup>1</sup>, Karina B. Santiago<sup>1</sup>, Eliza O. Cardoso<sup>1</sup>, Robson F. Carvalho<sup>2</sup>, Paula P. Freire<sup>2</sup>, Marjorie A. Golim<sup>3</sup> and José M. Sforcin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Morphology, Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil*

<sup>3</sup>*Botucatu Blood Center, School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil*

### Summary

Dendritic cells (DCs) represent a heterogeneous population of professional antigen presenting cells (APCs) and are essential for recognition and presentation of pathogens to T cells. Propolis, a resinous material produced by bees from various plant sources, exhibits numerous biological properties, highlighting its immunomodulatory action. Here, we assayed the effects of propolis on the maturation and function of human DCs, assessing the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, micro-RNAs and cell markers expression (TLR-4, HLA-DR, CD80, CD86, CD40), cytokines production (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12), and the bactericidal activity against *Streptococcus mutans*. DCs were generated from monocytes treated with IL-4 and GM-CSF and incubated with propolis and LPS. NF- $\kappa$ B in nuclear extract and cytokines were determined by ELISA. microRNAs expression was analysed by RT-qPCR and cell markers by flow cytometry. Colony-forming units were counted to assess the bactericidal activity of propolis-treated DCs. Propolis activated human DCs, inducing the NF- $\kappa$ B signaling pathway and TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 production. The inhibition of hsa-miR-148a and hsa-miR-148b abolished the inhibitory effects on HLA-DR and pro-inflammatory cytokines. The increased expression of hsa-miR-155 may be correlated to the increase in TLR-4 and CD86 expression, maintaining LPS-induced expression of HLA-DR and CD40. Such parameters may be involved in the increased bactericidal activity of DCs against *Streptococcus mutans*. These studies are particularly important to develop DC-based modulation strategies for the identification of promising sources for drug discovery.

**Keywords:** dendritic cells; propolis; immunomodulation

## Introduction

Dendritic cells (DCs) are a class of bone-marrow-derived cells found in the blood, epithelia and lymphoid tissues. They have the ability to recognize pathogens and initiate an immune response by internalizing extracellular antigens and presenting peptides to naïve T cells.<sup>1,2</sup> A great variety of signals can lead to the activation and maturation of DCs, including pathogen components such as lipopolysaccharide (LPS), cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , inflammatory mediators, hormones and neuropeptides.<sup>3-5</sup>

After antigen stimulation, mature DCs regulate the expression of cell markers such as Toll-like receptors (TLRs), molecules of the major histocompatibility complex (MHC), costimulatory molecules (CD40, CD80, CD86) and cytokine production (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12). Therefore, DCs promote an important link between innate and adaptive immunity, favoring the activation of the immune response to specific pathogens.

DCs may be regulated by different intracellular pathways, including NF- $\kappa$ B signaling pathway and microRNAs (miRNAs) expression. miRNAs are small (19–22 nucleotides) noncoding RNAs molecules derived from hairpin-structured precursors.<sup>6</sup> miRNAs directly bind to the potential target site of a specific mRNA, leading to mRNA degradation or at least to the repression of translation, leading to a decrease in protein expression. Recently, it has been reported that several miRNAs are involved in immune response modulation, affecting the differentiation, proliferation, cytokine production, as well as intracellular signaling pathways.<sup>7-</sup>

10

Propolis is a resinous and balsamic material of botanic origin. Irrespective of the botanical source, propolis has been routinely demonstrated to contain bioactive constituents, and may have untapped pharmacological potential.<sup>11</sup> Recently, our group produced a propolis-based odontological product whose patent was deposited in February 2015 (BR 10 2015 003982-4). Propolis and its isolated compounds (cinnamic and caffeic acids) have shown to modulate the early events of the immune response, inducing the expression of TLR-2 and TLR-4, MHC and costimulatory molecules (HLA-DR and CD80, respectively), cytokine production (TNF- $\alpha$  and IL-10) and the fungicidal activity of human monocytes.<sup>12-14</sup>

Although the effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on human monocyte-derived DCs has already been investigated<sup>15</sup> the modulatory effects of crude propolis extract on the maturation and function of human DCs has not yet been reported. Thus, the purpose of this study was to elucidate the regulatory effect of propolis on the NF- $\kappa$ B signaling pathway;

the expression of hsa-miR-148a, hsa-miR-148b and hsa-miR-155; the expression of cell markers (TLR-4, HLA-DR, CD40, CD86, CD80); the production of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-12); and the bactericidal activity of human DCs against *Streptococcus mutans*.

## **Materials and methods**

### *Propolis sample*

Propolis was collected in the Beekeeping Section, UNESP, Campus of Botucatu. Propolis was ground and 30% ethanolic extracts of propolis were prepared (30 g of propolis, completing the volume to 100 ml with 70% ethanol), in the absence of bright light, at room temperature, with moderate shaking. After a week, extracts were filtered and the dry weight of the extracts was calculated (130 mg/ml).<sup>16</sup> Propolis was diluted in RPMI 1640 culture medium (Cultilab, Brazil) containing L-glutamine (0.1 g/l), sodium bicarbonate (2.2 g/l), nonessential amino acids (10 ml/l) and supplemented with 10% fetal calf serum (complete medium). Specific dilutions were prepared for each assay in order to achieve different propolis concentrations: 5, 10, 20 and 40  $\mu$ g/ml. The same procedure was carried out with 70% ethanol (propolis solvent) found in propolis concentrations.

### *Dendritic cell culture and propolis treatment*

Immature DCs were generated from monocytes obtained from the buffy coat of ten healthy blood donors from the Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, after incubation with IL-4 (80 ng/ml) and GM-CSF (80 ng/ml) for 7 days.<sup>17,18</sup> Cell cultures were fed on day three with RPMI 1640 medium supplemented with these cytokines. Initially, the phenotype of the cells was analysed to confirm the differentiation of monocytes into DCs by CD14<sup>-</sup>/CD1a<sup>+</sup>/CD83<sup>low</sup> expression, which are characteristic of immature DCs.<sup>19,20</sup> This phenotype was utilized in all experiments described in this study.

The study was approved by the Ethics Committee of the Medical School, UNESP (CEP 4321-2012) and an informed consent was signed by all blood donors.

### *Cell viability*

DCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were incubated in 24-well plates for 24 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in the presence of propolis (5, 10, 20 and 40 µg/ml) in combination with LPS (10 µg/ml – Sigma, Aldrich). Control cells were incubated with medium alone. Cell viability was analyzed by 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT – Sigma-Aldrich, USA) colorimetric assay using the following protocol. DCs were incubated with 300 µl of MTT (1 µg/ml) for 3 h. After this period, the supernatant was removed and DMSO (200 µl) was added, promoting cell lysis and the detection of formazan crystals resulting from the mitochondrial activity of viable cells. The absorbance at 540 nm was recorded and non-cytotoxic concentrations of propolis were used.<sup>21</sup>

### *Detection of NF-κB in nuclear extract by ELISA*

DCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were distributed into 24-well flat-bottomed plates and incubated with different concentrations of propolis or medium alone as control for 2h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards, cells were incubated with LPS for 45 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.<sup>15</sup> DCs were washed with PBS containing 10% endotoxin-free fetal bovine serum on ice. Cells were then lysed using a nuclear extraction kit (Cayman Chemical Company, USA). The nuclear extract of each culture was obtained and stored at –80 °C until further analysis. The nuclear portion of p65NF-κB was detected by ELISA using a transcription factor ELISA kit (Cayman Chemical Company, USA), according to the manufacturer's instructions and quantified at 450 nm with a reference wavelength of 655 nm.<sup>22</sup>

### *RT-qPCR analysis of miRNAs*

### *RNA isolation and analysis*

Total RNA was extracted from human DCs after incubation with propolis and LPS for 12 h, using Trizol Reagent (Life Technologies, USA) solubilized in nuclease-free water and quantified (NanoVue Plus; GE HealthCare, UK). RNA purity was ensured by obtaining a 260/280 nm OD ratio equal to 2.0. Total RNA (2 µg) was treated with Amplification Grade Deoxyribonuclease I according to the protocol provided by Invitrogen (Life Technologies,

USA). The RNA was treated and incubated in DNase I (Life Technologies, USA) to remove any genomic DNA contamination.

#### *RT- qPCR*

The cDNA of each specific microRNA involved in DC maturation (hsa-miR-148a, hsa-miR-148b and hsa-miR-155) was synthesized from 2 µg of total RNA by using components from the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA) according to the manufacturer's protocols. Two microliters of cDNA, corresponding to 20 ng of total RNA from the RT reaction, were used as a template in the real-time qPCR, performed in a 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). Cycling conditions were: 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The reactions were carried out in duplicate using 3 µl of each primer and 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies, USA) in a final volume of 20 µl. Melting dissociation curves were performed to confirm that only a single product was amplified. Relative microRNA expression was analyzed using the Data Assist software 2.0 (Life Technologies, USA). Data were normalized by the microRNA U6 (endogenous control).

#### *Cell marker detection by flow cytometry*

TLR-4, HLA-DR, CD40, CD86, CD80 expression was evaluated by flow cytometry analysis. DCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were placed in polystyrene tubes for flow cytometry (Becton Dickinson and Company BD, USA) and centrifuged for 10 minutes at 200 g. The supernatant was discarded, and the cultures were incubated with propolis and LPS for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

The phenotype analysis was performed by incubating cells with specific monoclonal antibodies: 1 µg/ml of anti-CD14 conjugated to PerCP / Cy5.5 (clone HCD14 - BioLegend, USA), 0.50 µg/ml of anti-CD1a conjugated to FITC (clone HI149 - BioLegend, USA) and 1 µg/ml of anti-CD83 conjugated to APC (clone HB15e - BioLegend, USA).<sup>19,20</sup>

DCs were then separated into two groups. Group A cells were incubated with 2 µg/ml of anti-CD86 conjugated to Alexa Fluor 488 (clone IT2.2 – BioLegend, USA), 1 µg/ml of anti-CD80 conjugated to PE (clone D210 - BioLegend, USA) and 0.50 µg/ml of anti-CD40 conjugated to PerCP / Cy5.5 (clone 5C3 - BioLegend, USA). Group B cells were incubated

with 0.50 µg/ml of anti-HLA-DR conjugated to FITC (clone L243 - BioLegend, USA) and 1 µg/ml of anti-TLR-4 conjugated to PE (clone HTA125 - BioLegend, USA). A cell-free control was carried out in each instance, incubating isotypic antibodies (2 µg/ml) labeled with fluorochromes of the respective tests (PE, FITC, APC and PerCP / Cy5.5 - BioLegend, USA) for 30 minutes at 4°C in the dark. After incubation, the tubes were centrifuged at 200 g for 10 minutes and, after washing and fixing, cells were analysed by flow cytometry.<sup>23</sup> The analyses were performed on FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest to acquire and analyze cell multiparameters. Ten thousand DC events were optimized and DC gates were established on the basis of size parameters (FSC) and granularity (SSC). Data were expressed as the percentage of CD83 positive events, a characteristic marker of mature human DCs.

#### *Cytokine determination by ELISA*

To evaluate cytokine production, DCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were distributed into 24-well flat-bottomed plates (TPP Zellkultur und Labortechnologie, Switzerland) and incubated with propolis, LPS and culture medium alone for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, the concentrations of TNF-α, IL-6, IL-10 and IL-12p70 in the cell supernatants were measured by ELISA, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, USA). Briefly, a 96-well flat bottom Maxisorp plate (Thermo Scientific Nunc Maxisorp, USA) was coated with capture antibody specific to each cytokine. The plate was washed and blocked before 100 µL of the supernatants and serially diluted specific standards were added to the respective wells. Following a series of washings, each cytokine was detected using the specific conjugated detection antibody. Hydrogen peroxide plus tetramethylbenzidine were added into each well and, after color development, the plate was read at 450 nm, using an ELISA plate reader.

#### *Bactericidal activity of human DCs*

DCs ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were treated with different concentrations of propolis for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, stimuli were removed and cells were challenged with 500 µl of a *Streptococcus mutans* suspension (ATCC 25175) in RPMI 1640 medium containing  $1 \times 10^6$  bacteria/ml (DCs/bacteria ratio = 1:5) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Control cultures contained only bacteria without DCs. After 2 h, supernatants were collected and washed with Triton X-100 (1%) to lyse DCs, resulting in a final volume of 10 ml. 10 µl of cell lysate was plated onto

brain-heart infusion (BHI) agar medium (Difco Laboratories, USA) in triplicate, and plates were incubated at 37 °C.

The number of colony-forming units (CFU) per plate was counted after 48 h and the percentage (%) of bactericidal activity was determined by the formula:

$$\% \text{ bactericidal activity} = [1 - (\text{mean CFU on experimental cultures} / \text{mean CFU on control plates})] \times 100$$

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed by Graph Pad statistical software (Graph Pad Software, Inc., USA). Analysis of variance (ANOVA) and Dunnett method were employed. Comparisons of miRNAs after treatments were performed using the unpaired Student's t-test. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of 10 individuals and the differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## **Results**

#### *Differentiation of monocytes into DCs and cell viability*

Monocytes were properly differentiated into immature DCs, showing 94% of CD1a and 5% of CD83 expression (data not shown). No cytotoxic effects were seen in the viability of DCs after incubation with propolis or LPS ( $P > 0.05$ ) (Fig. 1).

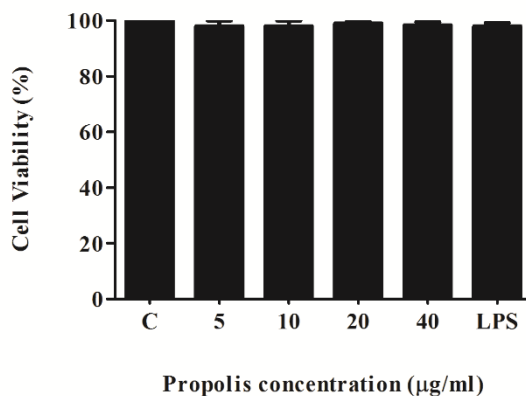


**Figure 1.** Cell viability (%) after incubation with propolis (5, 10, 20 and 40  $\mu\text{g/ml}$ ), LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) and only medium (C) for 24 h. (mean  $\pm$  SD; n=10).

### Detection of NF- $\kappa$ B in the nuclear extract

Propolis maintained the LPS-induced NF- $\kappa$ B activation at all concentrations without affecting LPS activity (positive control) (Fig. 2).

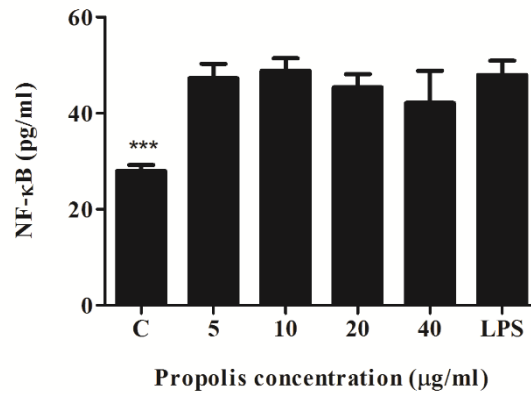
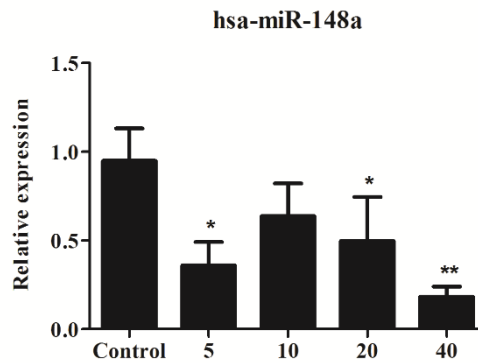


**Figure 2.** NF- $\kappa$ B quantification (pg/ml) in human DCs incubated with propolis (5, 10, 20 and 40  $\mu$ g/ml), LPS (10  $\mu$ g/ml) or medium alone (C) for 24 h. \*\*\*  $P < 0.0001$  vs LPS (mean  $\pm$  SD;  $n=10$ ).

### RT-qPCR analysis of miRNAs

Propolis decreased the expression of hsa-miR-148a and hsa-miR-148b ( $P < 0.01$ , using 5 and 20  $\mu$ g/ml;  $P < 0.001$  using 40  $\mu$ g/ml) by DCs. Regarding miRNA-155, propolis increased its expression ( $P < 0.01$ , using 40  $\mu$ g/ml) (Fig. 3).



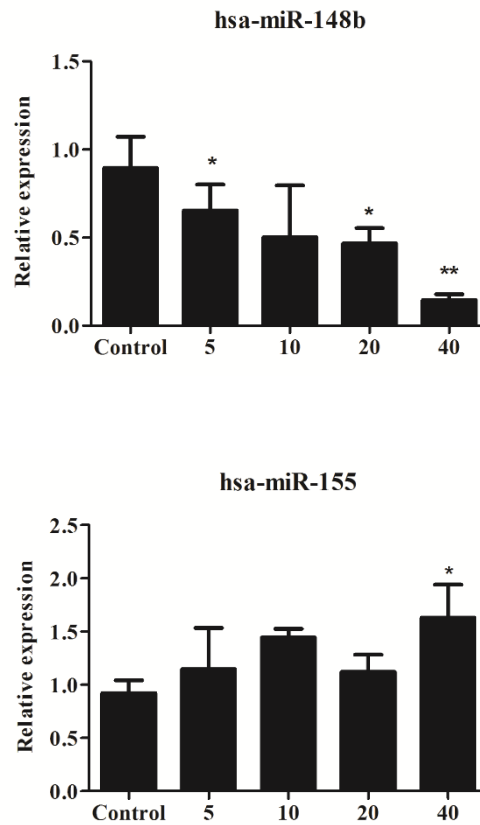


**Figure 3.** Relative miR expression in human DCs incubated with propolis (5, 10, 20 and 40 µg/ml) simultaneously with LPS (10 µg/ml) for 12 h. \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$  vs control (mean  $\pm$  SD; n=10).

#### *Flow cytometry analysis*

Propolis increased TLR-4 expression induced by LPS using 5 µg/ml ( $P < 0.01$ ) and maintained the activation induced by LPS on HLA-DR and CD40 in DCs. An increased CD86 expression by DCs was seen after incubation with propolis (10, 20 and 40 µg/ml) ( $P < 0.01$ ). On the other hand, CD80 expression by DCs was inhibited ( $P < 0.001$ ) after incubation with propolis at 40 µg/ml (Fig. 4).

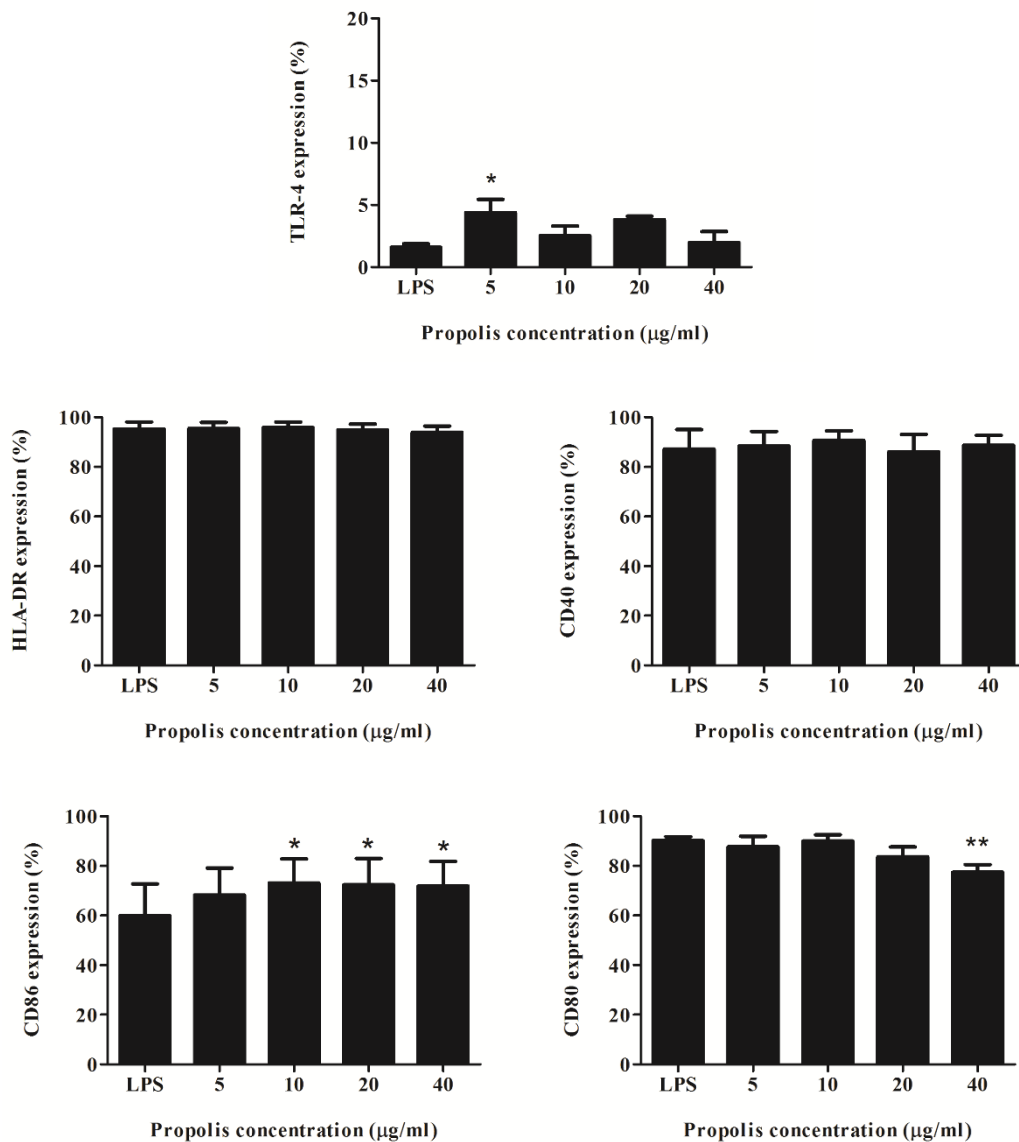


**Figure 4.** Percentage (%) of TLR4, HLA-DR, CD40, CD86 and CD80 expression in human DCs incubated with propolis/LPS (5, 10, 20 and 40 µg/ml) and LPS alone (10 µg/ml) for 24 h. \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$  vs LPS (mean  $\pm$  SD; n=10).

#### *Cytokine determination*

Propolis maintained LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 production at all concentrations. Furthermore, the treatment with propolis (5, 10 and 20 µg/ml) induced a higher production of IL-10. DCs incubated with propolis (20 and 40 µg/ml) decreased IL-12p70 production compared to LPS (Fig.5).

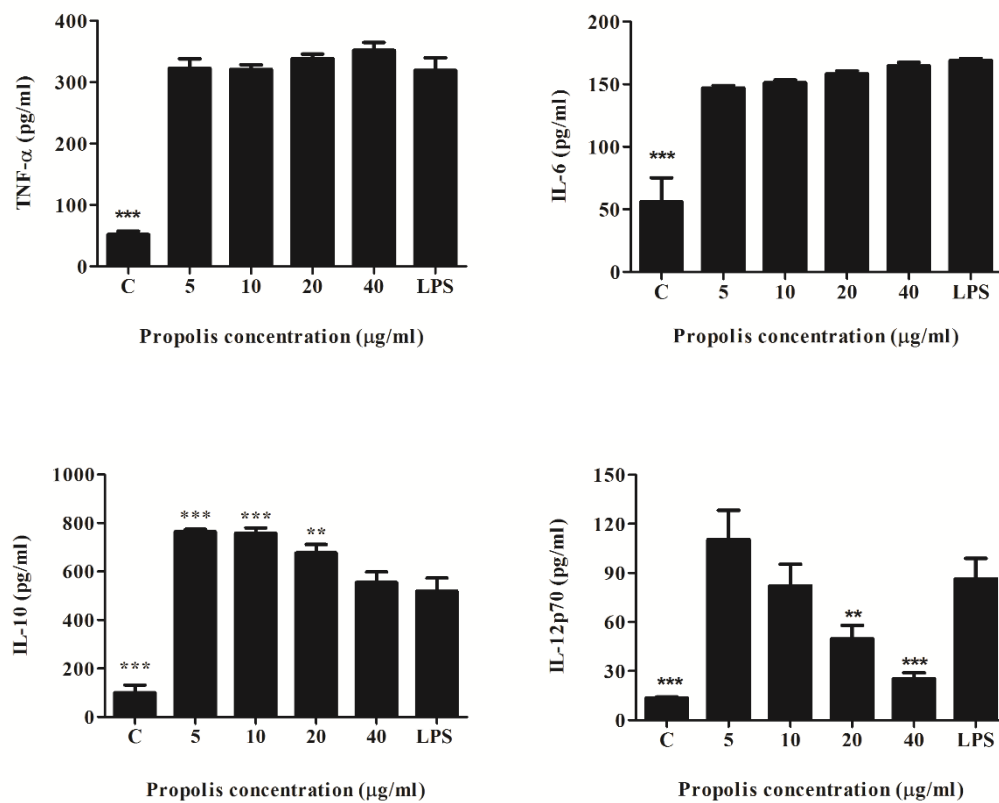


**Figure 5.** TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and IL-12p70 production (pg/ml) by human DCs incubated with propolis (5, 10, 20 and 40  $\mu$ g/ml), LPS (10  $\mu$ g/ml) and medium alone (C) for 24 h. \*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*  $P < 0.0001$  vs LPS (mean  $\pm$  SD; n=10).

#### *Bactericidal activity of human DCs*

Propolis increased the bactericidal activity of DCs against *Streptococcus mutans* at the highest concentrations (10, 20 and 40  $\mu$ g/ml) (Fig. 6).

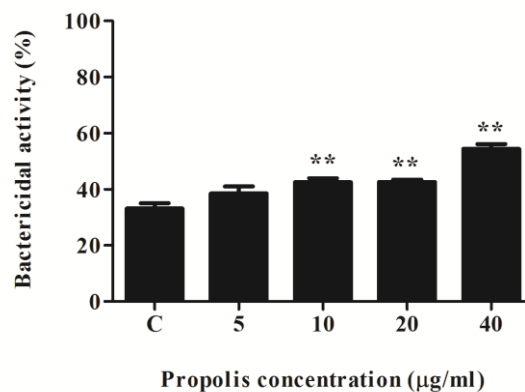


**Figure 6.** Percentage (%) of bactericidal activity of human DCs incubated with propolis (5, 10, 20 and 40 µg/ml) and medium alone (C) for 24 h and subsequently challenged with *Streptococcus mutans* for 2 h. \*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$  vs control (mean  $\pm$  SD; n=10).

## Discussion

Dendritic cells represent a heterogeneous family of antigen-presenting cells that play an important role in the initiation and direction of the immune response.<sup>24</sup> Several stimuli, such as IL-10, TGF- $\beta$ , vitamin D3, corticosteroids and natural products (fucoidan - sulfated class of polymers found in seaweeds) have been shown to modulate DC maturation and function.<sup>25,26</sup> Propolis – a resinous and balsamic product presenting several biological properties – has gained attention regarding its immunomodulatory action.<sup>27</sup> The main constituents of propolis from south-eastern Brazil were benzoic acid, dihydrocinnamic acid, coumaric acid, caffeic acid, prenyl-*p*-coumaric acid, flavonoids, artepillin C, trihydroxymethoxy flavonon, tetrahydroxy flavonon, and triterpenes.<sup>28</sup> In this study, we focused on the maturation and function of human DCs after treatment with propolis. Initially, we established that propolis did not affect the viability of these cells. Similarly, DCs incubated with fucoidan showed no alteration in DCs viability after incubation with this natural product; furthermore, it increased the expression of cell markers such as MHC-I/II, CD54 and CD86, which are important for T cell activation.<sup>26</sup> Thus, all concentrations of propolis were assayed for the maturation and function of DCs.

The process of DC maturation involves the activation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B, miRNAs expression, surface receptors expression, and cytokines production. Our data showed that DCs treated with propolis displayed an activator profile on the NF- $\kappa$ B signaling pathway. On the other hand, some studies showed that propolis contains compounds such as CAPE or chrysin that can inhibit the NF- $\kappa$ B pathway.<sup>29,30</sup> A propolis sample from Poland modulated the NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus in U87MG cells showing that this bee product

had a discreet effect on NF- $\kappa$ B in such cells.<sup>31</sup> Thus, it might be postulated that DC maturation may be regulated by different propolis samples or its constituents, affecting NF- $\kappa$ B signaling pathway and the subsequent production of inflammatory mediators, cytokines/chemokines and surface molecules expression.<sup>32-34</sup>

miRNAs may regulate the maturation and differentiation of DCs and other cells: miRNA-181a and miR-155 are involved in the regulation of the differentiation of B and T cells;<sup>35,36</sup> miR-17-5p, miR-20a, miR-106a and miR-223 are involved with monocytes and neutrophils;<sup>37-38</sup> and miR-146a, miR-155 and miR-21 are involved in the production of inflammatory cytokines such as IFN-I.<sup>39;40</sup> Increased miR-148/152 may inhibit the expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), which is a major downstream effector of  $\text{Ca}^{+2}$ , resulting in the inhibition of the production of several cytokines including IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and preventing the upregulation of MHC-II.<sup>41</sup>

In our work, propolis inhibited the expression of hsa-miR-148a and hsa-miR-148b and consequently abolished this inhibitory effect, since normal levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and HLA-DR were seen. On the other hand, propolis increased miR-155 expression, which is a general feature of DC activation and maturation in response to various TLR ligands, TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$ .<sup>42-44</sup> In response to LPS, human DCs upregulate the levels of miR-155 more than 100-fold. An increased miR-155 induces an inflammatory response upon triggering TLR-4 or IL-1 receptors.<sup>45</sup> LPS-activated miR-155-deficient DCs showed an impaired activation of CD4<sup>+</sup> T cells accompanied by the failed upregulation of MHC-II, CD40 and CD86.<sup>44</sup> Thus, miRNAs expression can affect multiple signaling pathways, which are not usually linked with each other, and the interaction of miRNAs between signaling pathways might lead to the development of a novel therapeutic agent.

Propolis increased the expression of TLR-4 and CD86 by DCs (possibly via the increased miRNA-155 expression), inhibited the expression of CD80 and maintained the LPS-induced activation of HLA-DR and CD40. The effects of CAPE were evaluated *in vitro* on the maturation of monocyte-derived dendritic cells, demonstrating that it maintained the expression of HLA-DR, CD86 and CD83 induced by LPS.<sup>15</sup> Thus, CAPE is probably involved in the increased expression of TLR-4 and CD86 in our work. Recent studies from our group showed that cinnamic acid (a constituent of propolis) decreased CD80 expression when incubated with human monocytes.<sup>12</sup> This is in agreement with our findings, since a decreased CD80 expression by DCs was observed after incubation with the highest concentration of propolis. TLR-4 expression was transiently increased when DCs were incubated with LPS for the maturation

process and then decreased significantly.<sup>46</sup> In fact, propolis induced a significant increase in TLR-4 expression in human monocytes; moreover, these authors also found an increased expression of CD80, TNF- $\alpha$  and IL-10 production, and in the fungicidal activity of these cells depending on the concentration.<sup>13</sup> Thus, propolis extract and its constituents can differentially modulate the expression of various surface markers in immune cells, depending on several factors such as concentration, period of incubation, and the method of extraction.

As to cytokine determination, DCs incubated with propolis maintained LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 production at all concentrations. The treatment with propolis at the lowest concentrations assayed induced a higher production of IL-10 by DCs than LPS. LPS induces high amounts of IL-10 by DCs, representing a negative feedback mechanism to control the robust production of inflammatory cytokines.<sup>43</sup> On the other hand, the lowest concentration of propolis maintained IL-12 induced by LPS, whereas higher concentrations inhibited the production of this cytokine. Thus, one may speculate that the increased expression of hsa-miR-155 induced by propolis was not correlated with the dose-dependent inhibition observed for IL-12. The treatment of dendritic cells with CAPE resulted in the inhibition of LPS-stimulated IL-12p70 production, suggesting that propolis consists of a number of constituents with antagonistic physiological actions.<sup>15</sup>

DCs treated with propolis displayed an increased bactericidal activity against *Streptococcus mutans*. Previous findings of our group have shown that propolis increased the bactericidal activity of peritoneal macrophages of mice against *Salmonella Typhimurium* and the fungicidal activity of these same cells against *Paracoccidioides brasiliensis*.<sup>47,48</sup> Recently, studies with human monocytes showed that the incubation with propolis, caffeic and cinnamic acids increased the fungicidal activity of these cells against *Candida albicans*.<sup>12-14</sup> Although the mechanisms by which propolis increased the microbicidal activity of DCs were not investigated, one may speculate that it might upregulate the production of reactive oxygen species by such cells. Propolis increased peroxide hydrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production by murine peritoneal macrophages,<sup>49</sup> however, micro-organisms may be destroyed by non-oxidative mechanisms, such as acidification of phagosomes, increased lysosomal content and interaction with the complement system components.<sup>50</sup>

In closing, our data suggests that propolis activates human DCs, inducing the NF- $\kappa$ B signaling pathway and TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 production. Moreover, the inhibition of hsa-miR-148a and hsa-miR-148b abolished the inhibitory effects on HLA-DR and pro-inflammatory cytokines. The increased expression of hsa-miR-155 may be correlated to the

increase in TLR-4 e CD86 expression, maintaining LPS-induced expression of HLA-DR and CD40. Such parameters may be involved in the increased bactericidal activity of DCs against *Streptococcus mutans*. These studies are particularly important to develop DC-based modulation strategies for the use of propolis in regulating immune responses. These findings contribute not only to a better understanding of the immunomodulatory action of propolis on DCs, but also to the identification of promising sources for drug discovery.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP 2012/13996-4 and 2012/14176-0) for the grant. We also thank Dr. Anthony James Farlow for English assistance.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest to disclose.

## REFERENCES

- 1 Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; **30**:1-22.
- 2 Collin ML, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunol.* 2013; 140:22-30.
- 3 Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; **18**:767-811.
- 4 Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G, Endres S: Enhanced dendritic cell maturation by TNF- $\alpha$  or cytidinephosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J. Immunol.* 2000; **165**:6278–6286.
- 5 Ding X, Yang W, Shi X, Du P, Su L, Qin Z, Chen J, Deng H: TNF receptor 1 mediates dendritic cell maturation and CD8 T cell response through two distinct mechanisms. *J. Immunol.* 2011; **187**:1184–1191.
- 6 Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL. regulation of the mir155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* 2013; **532**:1–12.

- 7 Lindsay M.A. MicroRNAs and the immune response. *Trends Immunol.* 2008; **29**:343–351.
- 8 Baltimore D, Boldin MP, O’Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* 2008; **9**:839–845.
- 9 Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; **8**:120–130.
- 10 Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009; **136**:26–36.
- 11 Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 2011; **133**:253-260.
- 12 Conti BJ, Búfalo MC, Golim MA, Bankova V, Sforcin JM. Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013; **2013**:1-8.
- 13 Búfalo MC, Graciani APB, Conti BJ, Golim MA, Sforcin JM. The immunomodulatory effect of propolis and caffeic acid on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 2014; **66**:1497-1504.
- 14 Búfalo MC, Sforcin JM. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. *J. Pharm. Pharmacol.* 2015; **67**:740-745.
- 15 Wang LC, Lin YL, Liang YC, Yang YH, Lee JH, Yu HH, Wu WM, Chiang BL. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. *BMC Immunol.* 2009; **10**:1-13.
- 16 Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J. Ethnopharmacol.* 2005; **98**:301-5.
- 17 Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 2003; **197**:7-17.
- 18 Landi A, Babiuk LA, Van D, Little-Van D, Hurk S. Dendritic cells matured by a prostaglandin E2-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF- $\alpha$  or LPS. *Immunobiol.* 2011; **6**:649-62.
- 19 Bykovskaia SN, Shurin GV, Graner S, Bunker ML, Olson W, Thomas R, Shurin MR, Marks S, Storkus WJ, Shogan J. Differentiation of immunostimulatory stem-cell- and monocyte-derived dendritic cells involves maturation of intracellular compartments responsible for antigen presentation and secretion. *Stem Cells* 2002; **20**:380-393.

- 20 Polancec DS, Munic Kos V, Banjanac M, Vrancic M, Cuzic S, Belamaric D, Parnham MJ, Polancec D, Erakovic Haber V. Azithromycin drives *in vitro* GM-CSF/IL-4- induced differentiation of human blood monocytes toward dendritic-like cells with regulatory properties. *J. Leukoc. Biol.* 2012; **91**:229-243.
- 21 Najafi MF, Vahedy F, Seyyedin M, Jomehzahed HR, Bozary K. Effect of water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnol.* 2007; **54**:49–56.
- 22 Bannwart CF, Nakaira-Takahagi E, Golim MA, De Medeiros LT, Romão M, Weel IC, Peraçoli MT. Downregulation of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) pathway by silibinin in human monocytes challenged with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Life Sci.* 2010; **86**:800-886.
- 23 Nakaira-Takahagi E, Golim MA, Bannwart CF, Puccia R, Peraçoli MT. Interactions between TLR2, TLR4 and mannose receptors with gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* induce cytokine production by human monocytes. *Med. Mycol.* 2011; **49**: 694-703.
- 24 Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2005; **560**:11-18.
- 25 Woltman AM, Van Der Kooij SW, Coffey PJ, Offringa R, Daha MR, Van Kooten C. Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood* 2003; **101**:1439-1445.
- 26 Kim M, Joo H. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunol. Lett.* 2008; **115**:138-143.
- 27 Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 2007; **113**: 1-14.
- 28 Conti BJ, Bankova V, Sforcin JM. Chemical composition of the same Brazilian propolis sample analysed in 1997 and in 2012: no freezing effect. *Nat. Prod. Commun.* in press.
- 29 Nomura M, Kaji A, Ma W, Miyamoto K, Dong Z. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Mol. Carcinog.* 2001; **31**:83-89.
- 30 Ha SK, Moon E, Kim SY: Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF-κB and JNK activations in microglia cells. *Neurosci. Lett.* 2010, **485**:143–147.
- 31 Markiewicz-Żukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complement. Altern. Med.* 2013; **13**:1-9.
- 32 Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 1998; **188**:2175–2180.

- 33 Kaisho T, Tanaka T, Turning NF-kappaB and IRFs on and off in DC. *Trends Immunol.* 2008; **29**:329–336.
- 34 Neves BM, Cruz MT, Francisco V, Garcia-Rodriguez C, Silvestre R, Cordeiro-da- Silva A, Dinis AM, Batista MT, Duarte CB, Lopes MC. Differential roles of PI3-Kinase, MAPKs and NF-kappaB on the manipulation of dendritic cell T(h)1/T(h) 2 cytokine/chemokine polarizing profile. *Mol. Immunol.* 2009; **46**:2481–2492.
- 35 Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007; **129**:147–161.
- 36 Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, Van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007; **316**:608–611.
- 37 Fontana L, Pelosi E, Greco P, Racanicchi S, Testa U, Liuzzi F, Croce CM, Brunetti E, Grignani F, Peschle C. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat. Cell. Biol.* 2007; **9**:775–787.
- 38 Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by micro- RNA-223. *Nature* 2008; **451**:1125–1129.
- 39 Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappa B dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; **103**:12481– 12486.
- 40 Sheedy FJ, Palsson-Mcdermott E, Hennessy EJ, Martin C, O’leary JJ, Ruan Q, Johnson DS, Chen Y, O’neil. L.A. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat. Immunol.* 2010; **11**:141–147.
- 41 Liu XZ, Zhan L, Xu F, Ma D, Li Z, Guo N, Li X. MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKII $\alpha$ . *J. Immunol.* 2010; **185**:7244–7251.
- 42 Lu C, Huang X, Zhang X, Roensch K, Cao Q, Nakayama KI, Blazar Br, Zeng Y, Zhou X. miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cells development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27Kipl, KPC1, and SOCS-1. *Blood* 2011; **117**:4293-4303.

- 43 Zhou H, Huang X, Cui H, Luo X, Tang Y, Chen S, Wu L, Shen N. miR-155 and its star-form partner miR-155\* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2010; **116**:5885-5894.
- 44 Dunand-Sauthier I, Santiago-Raber ML, Capponi L, Vejnar CE, Schaad O, Irla M, Seguin-Estevez Q, Descombes P, Zdobnov EM, Acha-Orbea H, Reith W. Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. *Blood* 2011; **117**:4490-4500.
- 45 Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K., Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 TO TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* 2000; **5**:649-658.
- 46 Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J.H, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-Like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 2001; **166**:249-255.
- 47 Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella* Typhimurium. *Int. Immunopharmacol.* 2005; **5**:359-68.
- 48 Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC, Bankova V, Sforcin, JM. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol.* 2002; **79**:331-334.
- 49 Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom Anim Toxins* 2000; **6**:205-219.
- 50 Moonis M, Ahmad I, Bochhowot BW. Macrophages in host defense – an overview. *Indian J. Biochem. Biophys.* 1992; **29**:115-122.

*Anexos*

ANEXO 1

UNESP  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CAMPUS DE BOTUCATU**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**  
**BOTUCATU- SP-CEP-18.618-970 -FONE: (14) 3880-0445**

---

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA  
DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

**Título da pesquisa: “AÇÃO DA PRÓPOLIS SOBRE A MATURAÇÃO E FUNÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS”**

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar células mononucleares do sangue periférico, após incubação com a própolis, para compreender sua ação sobre estas células.

Para poder participar, o Senhor será questionado sobre uso de medicamentos ou drogas, bem como doenças, pois estes critérios impedem a participação. O único e possível desconforto é a retirada do sangue, e após a coleta de 40 mL de sangue, o mesmo será utilizado nos laboratórios da disciplina de Imunologia, onde será desenvolvido o estudo. Para responder quaisquer perguntas ou dúvidas, você poderá entrar em contato com os responsáveis por este trabalho. Para qualquer dúvida adicional, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143.

Informamos que o Sr. possui total liberdade de recusar ou de retirar o seu consentimento de participação neste estudo, sendo que esta ação não causará qualquer transtorno à sua pessoa. Informamos também que todas as informações obtidas neste estudo serão identificadas somente por número, sendo que seu nome não aparecerá quando os resultados do estudo forem apresentados.

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, este documento será elaborado em 2 vias, sendo uma para o participante da pesquisa e outra para o arquivo do pesquisador.

O sujeito da pesquisa foi devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador e/ou representante sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, bem como os possíveis riscos decorrentes da participação.

Local e data: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do sujeito de pesquisa: \_\_\_\_\_

Prof. Adj. José Maurício Sforcin  
Responsável pelo Projeto  
Depto. Microbiologia e Imunologia  
IB – UNESP – Campus de Botucatu  
Fone: 14-3880-0445 / sforcin@ibb.unesp.br

Bruno José Conti  
Doutorando do Projeto  
Depto. Microbiologia e Imunologia  
IB – UNESP – Campus de Botucatu  
Fone: 14-3880-0425 / contibj@ibb.unesp.br

ANEXO 2



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de setembro de 2012

Of. 419/2012

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. José Maurício Sforcin  
Departamento de Micro/Imuno do  
Instituto de Biociências de Botucatu

Prezado Dr. José Maurício,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4321-2012) "Ação da própolis sobre a maturação e função de células dendríticas humanas", a ser conduzido por Bruno José Conti, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/09/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP