



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AÇÃO IMUNOMODULADORA DA PRÓPOLIS NA APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA

FERNANDA LOPES CONTE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas – Estrutura e Função.

Orientador: Prof. Adj. José Maurício Sforcin

Co-orientadora: Dr^a Karina Basso Santiago

BOTUCATU – SP
2017



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**AÇÃO IMUNOMODULADORA DA PRÓPOLIS NA
APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA**

FERNANDA LOPES CONTE

ORIENTADOR: PROF. ADJ. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

CO-ORIENTADORA: Dr^a KARINA BASSO SANTIAGO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas – Estrutura e Função.

Orientador: Prof. Adj. José Maurício Sforcin

Co-orientadora: Dr^a Karina Basso Santiago

**BOTUCATU – SP
2017**

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

Conte, Fernanda Lopes.

Ação imunomoduladora da própolis na apresentação antigênica / Fernanda Lopes Conte. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Maurício Sforcin

Coorientador: Karina Basso Santiago

Capes: 21100004

1. Própolis. 2. Resposta imune. 3. Monócitos. 4. Fatores imunológicos. 5. Antígenos.

Palavras-chave: Monócitos; Própolis; Resposta imune.

Dedicatória

*Àqueles que me deram a vida,
que me orientaram no caminho do amor e da fé em Deus,
que se esforçaram pela minha educação e para a realização dos meus sonhos,
e que com muito amor e dedicação trilharam esse caminho ao meu lado:*

Aos meus amados pais, Luiz Fernando e Maria José, dedico esse trabalho.

*“[...] Agradeço a Deus por ter escolhido você para orientar os meus passos.
Foi com você que aprendi que quando a jornada torna-se difícil
Ele nos toma nos braços.” (Silvia Schmidt)*

Agradecimentos especiais

À Deus, que em seu infinito amor e bondade, me abençoa em todos os momentos e me sustenta nas batalhas da vida, concedendo-me força e coragem para enfrentar os desafios;

Ao meu irmão Tiago, e aos demais familiares, pelo incentivo, apoio e torcida no decorrer dessa jornada;

Ao meu namorado David, pelo amor a mim dedicado, pela paciência, força e companheirismo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, José Maurício Sforcin, pela confiança e oportunidade de fazer parte dessa excelente equipe. E que com empenho me orientou no desenvolvimento desse trabalho e possibilitou meu crescimento profissional;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, por possibilitar a realização desse trabalho e aos funcionários da seção técnica de pós-graduação pela assistência prestada;

À minha co-orientadora, Karina Basso Santiago, e aos demais membros do grupo, Bruno, Eliza, Lucas e Yahima, pelos ensinamentos e por me auxiliarem na realização dessa pesquisa. Agradeço também aos que passaram pela equipe, Anthony, Ariane e Lívia, pelos momentos de descontração;

Aos professores Maria Teresa Cruz, Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Marjorie de Assis Golim e João Pessoa Araújo Júnior, e suas equipes, pela ajuda prestada durante a realização desse projeto;

Aos docentes, funcionários e alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela saudável convivência e pelas colaborações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio à pesquisa (2015/03493-3), que viabilizaram a realização desse projeto;

RESUMO

A própolis é um produto resinoso, elaborado pelas abelhas a partir de diferentes partes das plantas, e se destaca por suas inúmeras propriedades biológicas, e pela possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica. Recentemente, nosso grupo tem estudado sua ação sobre monócitos – células do sistema fagocítico mononuclear que exercem importante função na resposta imune. Neste projeto, visamos investigar a possível ação moduladora da própolis na apresentação de antígenos por monócitos humanos, utilizando um antígeno infeccioso (subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* - EtxB), um antígeno tumoral (MAGE-1), o ácido retinóico (AR) e lipopolissacarídeo (LPS), simultaneamente ou não a própolis, avaliando o possível efeito citotóxico dos tratamentos, a expressão de receptores celulares (TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD40, CD80) e a produção de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12). A modulação da autofagia foi avaliada através da expressão de genes que codificam as proteínas Beclin-1 e LC3-II, utilizando a rapamicina simultaneamente ou não a própolis. A própolis não alterou a viabilidade dos monócitos humanos e exerceu efeito citoprotetor nas células incubadas com os estímulos. A própolis manteve a expressão basal dos receptores de superfície celular; porém, em associação com MAGE-1 e LPS, diminuiu a expressão de CD40 estimulada pelos antígenos isoladamente. Em associação com AR, a própolis manteve a ação do antígeno sobre os receptores. Já a associação da própolis com a EtxB, reduziu a expressão de TLR-4, CD40 e CD80. A própolis inibiu a produção de TNF- α (associada com EtxB e MAGE-1) e IL-6 (associada com AR e MAGE-1), e aumentou a produção de IL-10 (associada com MAGE-1). A própolis, isoladamente, não estimulou a expressão dos genes que codificam Beclin-1 e LC3-II, mas sua associação com rapamicina inibiu a expressão gênica induzida pelo fármaco, sugerindo sua capacidade inibitória sobre a autofagia. Nossos resultados sugerem que a própolis exerceu ação imunomoduladora na presença de antígenos, favorecendo respostas anti-inflamatórias. Ademais, seu efeito modulador na apresentação antigênica é independente da autofagia. Esses resultados abrem perspectivas para o uso da própolis no auxílio do tratamento de condições inflamatórias.

Palavras-chave: própolis; monócito; imunomodulação; apresentação antigênica.

ABSTRACT

Propolis is a resinous product made by bees from different parts of plants, showing several biological properties and a possible application in the pharmaceutical industry. Recently, our group has studied its action on monocytes – cells of the mononuclear phagocytic system that exert an important function in the immune response. In this project, we aimed to investigate the modulatory action of propolis on antigen presentation by human monocytes, using an infectious antigen (B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin – EtxB), a tumor antigen (MAGE-1), retinoic acid (RA) and lipopolysaccharide (LPS), simultaneously or not with propolis, evaluating a possible cytotoxic effect of the treatments, the expression of cellular receptors (TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD40, CD80) and cytokine production (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12). Modulation of autophagy was assessed by gene expression of Beclin-1 and LC3-II, using rapamycin simultaneously or not to propolis. Propolis did not affect the viability of human monocytes and exerted a cytoprotective effect on cells incubated with the stimuli. Propolis maintained the basal expression of cell surface receptors; however, in association with MAGE-1 and LPS, it decreased CD40 expression that was stimulated by antigens. In association with RA, propolis maintained the antigen action on receptors. The association of propolis with EtxB reduced TLR-4, CD40 and CD80 expression. Propolis inhibited TNF- α (associated with EtxB and MAGE-1) and IL-6 (associated with AR and MAGE-1), and increased IL-10 (associated with MAGE-1) production. Propolis alone did not stimulate Beclin-1 and LC3-II expression; however, in association with rapamycin, it inhibited gene expression that was induced by the drug, suggesting propolis inhibitory action on autophagy. Data suggest that propolis exerted an immunomodulatory action in the presence of antigens, favoring anti-inflammatory responses. In addition, the modulatory effect of propolis on antigen presentation is independent of autophagy. These results open perspectives for the use of propolis in the treatment of inflammatory conditions.

Keywords: propolis; monocyte, immunomodulation; antigenic presentation.

SUMÁRIO

Introdução	9
1. Própolis	9
1.1. Definição	9
1.2. Composição química e fontes botânicas	9
1.3. Propriedade biológicas	10
2. Monócitos	11
2.1. Definição	11
2.2. Ações dos monócitos na resposta imunológica	12
3. Autofagia	15
4. Antígenos utilizados neste projeto	16
4.1. Ácido retinóico	16
4.2. Subunidade B da Enterotoxina Termolábel de <i>Escherichia coli</i>	17
4.3. Lipopolissacarídeo	17
4.4. <i>Melanoma-associated antigen 1</i> (MAGE-1)	18
5. Justificativa do trabalho	19
Objetivos	20
Material e métodos	21
1. Obtenção da amostra de própolis e antígenos	21
2. Obtenção de monócitos humanos	22
3. Viabilidade de monócitos humanos após incubação com própolis e antígenos	23
4. Cultura de monócitos para avaliação de marcadores de superfície celular e dosagem das citocinas	24
4.1. Avaliação de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo	24
4.2. Quantificação da produção de citocinas pela técnica de ELISA	25
5. Avaliação da expressão de transcritos relacionados à autofagia	26
6. Análise estatística	27
Resultados e discussão	28
1. Viabilidade celular	28
2. Expressão de marcadores de superfície celular	30
3. Produção de citocinas	39
4. Expressão de genes relacionados à autofagia	49
Conclusões	52
Considerações finais	54
Referências bibliográficas	55
Manuscrito	64
Anexo 1	86

Introdução

1. Própolis

1.1. Definição

A própolis é um produto resinoso e balsâmico, elaborado pelas abelhas a partir de diferentes partes das plantas como brotos, ramos, cascas de árvores, exsudados resinosos e botões florais, ao qual as abelhas adicionam secreções salivares, cera e pólen (Bankova, 2005). Constitui um material lipofílico, apresentando-se duro e quebradiço quando em temperaturas baixas, e com aspecto pegajoso e flexível em temperaturas mais elevadas. Seu odor é aromático e agradável e sua coloração é variada, dependendo da origem botânica, podendo apresentar-se nas cores marrom, verde, vermelha e preta (Silva-Carvalho, 2015).

A palavra própolis é originada do grego: “pro” = defesa, e “polis” = cidade (Ghisalberti, 1979). Dessa forma, a própolis é utilizada pelas abelhas para selar aberturas da colmeia, com a finalidade de controlar as variações de temperatura no seu interior. Também é utilizada para embalsamar insetos e outros invasores que morrem dentro da colmeia, com o objetivo de evitar sua decomposição e manter o ambiente interno asséptico, protegendo-o contra micro-organismos (Salatino *et al.*, 2005).

1.2. Composição química e fontes botânicas

De modo geral, a própolis é composta por cerca de 50% de resina, 30% de cera de abelha, 10% de óleos aromáticos e essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo detritos (Burdock, 1998). Porém, sua composição química é extremamente complexa, variando conforme a localização geográfica e a flora local. Foram identificados mais de 300 componentes presentes na própolis, sendo os principais componentes biologicamente ativos da própolis brasileira os ácidos diterpênicos e ácidos *p*-cumáricos prenilados. Há também chalconas, ácido benzóico, benzoaldeído, álcoois, acetona, compostos fenólicos, ácido cinâmico, ácido cafeico e derivados, di- e triterpenos (De Castro, 2001). Os constituintes da própolis como materiais cerosos, bálsamos, óleos essenciais e derivados

fenólicos, podem ser extraídos em solventes como etanol, éter, acetona, tolueno e tricloroetileno (Cunha *et al.*, 2004). A cera e as impurezas podem ser removidas durante o processamento da amostra (Burdock, 1998).

Devido à complexa e variável composição química da própolis, é importante que os estudos de suas atividades biológicas sejam sempre associados às fontes botânicas e à composição química da amostra avaliada, conforme revisado por Sforcin (2016). Assim, as principais fontes de própolis no apiário da UNESP, Campus de Botucatu, são *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo), seguida de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze e *Eucalyptus citriodora* Hook (Bankova *et al.*, 1999). Os compostos presentes na própolis produzida nesse apiário foram analisados por técnicas cromatográficas, revelando que dentre seus principais grupos estão os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos aromáticos, benzopiranos), di- e triterpenos e óleos essenciais (Bankova *et al.*, 1998; Sforcin, 2007). Dados de nosso grupo evidenciaram que variações sazonais na composição da própolis não são significativas, havendo concentrações dos compostos biologicamente ativos em todas as estações do ano (Boudourova-Krasteva *et al.*, 1997; Sforcin, 2007).

1.3. Propriedades biológicas

Devido suas propriedades, a própolis tem sido utilizada na medicina popular desde a antiguidade. Os egípcios conheciam bem suas propriedades antiputrefativas e utilizavam-na para mumificação de cadáveres. Gregos e romanos empregavam a própolis no tratamento de feridas, onde exercia ação antisséptica e cicatrizante, sendo também utilizada durante a segunda guerra mundial para a mesma finalidade. Os persas descreviam-na como um medicamento para tratar eczemas, mialgia e reumatismo. Já os incas utilizavam a própolis como agente antipirético. Assim, esse apiterápico tem sido utilizado desde a antiguidade na medicina humana para diversas finalidades, mas foi em 1985 que a própolis começou a ser considerada uma substância promissora na área da farmacologia, como revisado por Silva-Carvalho *et al.* (2015). Desse modo, a própolis tem sido utilizada até os dias atuais devido às suas inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas, e tem se destacado pela possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica (Sforcin, 2016).

A própolis é descrita por apresentar importantes atividades biológicas, como antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (Sforcin,

2016). Sua atividade antimicrobiana é uma das mais bem documentadas, sendo eficaz contra diferentes micro-organismos. O estudo da ação antibacteriana contra várias cepas tem demonstrado que a própolis é mais ativa contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (Sforcin *et al.*, 2000). A própolis também apresenta atividade antifúngica (Sforcin *et al.*, 2001; Ota *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2009), anti-parasitária (Freitas *et al.*, 2006; Salomão *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2013) e antiviral (Búfalo *et al.*, 2009), sendo que ela pode agir diretamente sobre os micro-organismos *in vitro* ou estimular o sistema imune para eliminá-los *in vivo* (Sforcin & Bankova, 2011). Dessa forma, a própolis pode induzir aumento na atividade antimicrobiana de macrófagos contra *Paracoccidioides brasiliensis* (Murad *et al.*, 2002), contra *Samonella Typhimurium* (Orsi *et al.*, 2005), de monócitos contra *Candida albicans* (Cardoso *et al.*, 2017), e células dendríticas (DCs) contra *Streptococcus mutans* (Conti *et al.*, 2016).

Além disso, a própolis apresenta outras atividades sobre o sistema imunológico, sendo capaz de modular os eventos iniciais da resposta imune, induzindo a expressão de moléculas importantes no desenvolvimento da resposta imunológica, como os receptores semelhante a *Toll* (TLR)-2 e TLR-4 (Orsatti *et al.*, 2010), a molécula co-estimulatória CD80 e citocinas pró e anti-inflamatórias (Búfalo *et al.*, 2014), modulando vias do sistema complemento (Ivanovska *et al.*, 1995), ativando o fator de transcrição NF- κ B (Conti *et al.*, 2016), bem como aumentando a produção de anticorpos (Sforcin *et al.*, 2005).

Nosso grupo tem investigado a ação da própolis sobre monócitos humanos, os quais foram estudados também neste trabalho de mestrado.

2. Monócitos

2.1. Definição

Monócitos são células do sistema fagocítico mononuclear – uma família de fagócitos profissionais derivados de progenitores hematopoiéticos de origem mielóide (Hume, 2015). Desenvolvem-se na medula óssea, a partir da divisão dos monoblastos, e depois são liberados na corrente sanguínea (Geissmann *et al.*, 2003). Essas células representam cerca de 5 a 10% dos leucócitos circulantes no sangue periférico humano e possuem morfologia heterogênea,

podendo variar quanto ao tamanho, granulidade e morfologia do núcleo (Gordon & Taylor, 2005).

Os monócitos podem ser divididos em subtipos distinguidos de acordo com alguns parâmetros, como a expressão de receptores, presença de moléculas de superfície específica e a habilidade de diferenciação após o estímulo com citocinas ou moléculas microbianas (Shi & Pamer, 2011). Monócitos humanos caracterizados por alta expressão de CD14 e que não expressam CD16 são chamados de monócitos clássicos, e são conhecidos por participarem de respostas inflamatórias induzidas por agentes patogênicos ou por dano tecidual. (Lee *et al.*, 2013). Esses representam 80% a 90% dos monócitos presentes no sangue (Auffray *et al.*, 2009). Por outro lado, aqueles que expressam CD16 e apresentam baixa expressão de CD14 são chamados monócitos não-clássicos, os quais são descritos por atenuarem propriedades inflamatórias em resposta a danos vasculares, facilitando a cicatrização do tecido e a revascularização. Ainda, mais recentemente foi descrito um subtipo intermediário entre os monócitos clássicos e não-clássicos, que são encontrados em baixa quantidade na corrente sanguínea e se expandem em respostas a citocinas e inflamação, como revisado por Lee *et al.* (2013). Assim, análises fenotípicas e funcionais demonstram que os monócitos exercem papéis importantes e, algumas vezes, divergentes em várias condições patológicas (Xiong & Pamer, 2015).

2.2. Ações dos monócitos na resposta imunológica

Os monócitos possuem importante função na homeostasia, removendo células apoptóticas e componentes tóxicos do organismo, bem como na resposta imune, atuando como células apresentadoras de antígenos (APCs) (Auffray *et al.*, 2009). São também importantes em muitas doenças com componentes inflamatórios, como as infecções, doenças cardiovasculares, diabetes tipo I e câncer (Hettinger *et al.*, 2013). A função dos monócitos recrutados é altamente dependente do contexto da inflamação, do sítio e do microambiente nesse local, onde podem também produzir uma gama complexa de citocinas e fatores de crescimento (Xiong & Pamer, 2015).

Em determinadas condições, a saída dos monócitos da medula óssea em direção à corrente sanguínea é aumentada, sendo mediada pela interação CCR2–CCL2 ou induzida por citocinas, entre outros sinais (Xiong & Pamer, 2015). Uma vez na circulação, essas células

possuem a habilidade de se mover para os sítios onde são necessárias, diferenciando-se em macrófagos nos tecidos (Shi & Pamer, 2011). Dessa forma, os monócitos são rapidamente recrutados para locais de lesão ou infecção, podendo também migrar diretamente do sangue para os linfonodos (Geissmann *et al.*, 2008).

Os monócitos são fundamentais no desenvolvimento da resposta imune, mediando a defesa inicial do hospedeiro contra micro-organismos (Shi & Pamer, 2011), sendo conhecidos, juntamente com outras APCs, como “orquestradores” da resposta imune, pois o processo de captação e apresentação do antígeno é essencial para definir o tipo de resposta a ser montada, bem como sua intensidade, extensão e duração (De Lastic *et al.*, 2016). Os monócitos podem originar também outras APCs, como macrófagos e células dendríticas.

Monócitos possuem receptores semelhantes a Toll (TLRs) que reconhecem micro-organismos através da detecção de produtos ou estruturas microbianas conservadas, denominados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Os PAMPs estão ausentes em células eucarióticas, mas podem estar presentes tanto em micro-organismos patogênicos ou não, fazendo com que os TLRs sejam capazes de distinguir o próprio do não-próprio (Medzhitov, 2001). TLRs reconhecem um diverso, porém limitado, número de PAMPs. Como exemplo, TLR-2 reconhece uma grande quantidade de produtos microbianos, como peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, lipoproteínas, componentes de parede celular de micobactérias. Tal variedade de ligantes pode ser explicada, em parte, pela cooperação existente entre TLR-2 e TLR-1 ou TLR-2 e TLR-6, ocorrendo formação de heterodímeros. Já TLR-4 tem como agonistas LPS de bactérias Gram-negativas, ácido lipoteicóico e a proteína de fusão F do vírus respiratório sincicial (RSV). Ácidos nucleicos virais ou bacterianos são reconhecidos por TLR-3/7/8 e 9 enquanto o TLR-5 tem como ligante a flagelina bacteriana (Takeda & Akira, 2005).

Após o reconhecimento de micro-organismos, há ativação de vias de transdução de sinal e ativação de vários fatores de transcrição, como, por exemplo, NF- κ B e STAT-3, relacionados à expressão de genes envolvidos na resposta imune do organismo, como citocinas, quimiocinas, moléculas de histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimulatórias importantes para ativação das células T, como CD80 (B7-1) que se liga ao CD28, e CD40, a qual atua como uma molécula transmembrânica sinalizadora, regulando um amplo espectro de processos moleculares e celulares, incluindo o início e progressão das respostas adaptativas celular e humoral (Medzhitov, 2001; Han *et al.*, 2003). Dessa forma, os

monócitos apresentam antígenos aos linfócitos T via MHC (I ou II), fornecendo o primeiro sinal para ativação dos linfócitos T, e expressam também moléculas coestimulatórias (B7-1, B7-2), propiciando o segundo sinal para ativação destas células, além de secretarem citocinas que determinam o perfil de linfócito efetor gerado após a ativação.

Assim, além de seu papel no reconhecimento de antígenos, os monócitos têm participação fundamental na ativação, polarização e expansão dos linfócitos, podendo contribuir para a ativação primária de células T e para o desenvolvimento de células T de memória. Dessa forma, células Th *naive* podem ser diferenciadas em subtipos efetores como, por exemplo, Th1, Th2, Th17 e T reguladora (Treg), as quais apresentam funções divergentes, podendo levar a inflamação ou tolerância, desencadeando respostas imunes protetoras ou patogênicas (Geissmann *et al.*, 2008).

As células do tipo Th1 estão envolvidas na resposta celular e nas reações de hipersensibilidade tardia, sendo particularmente importantes na resposta contra microorganismos intracelulares. A polarização e expansão de células Th1 é facilitada pela presença da citocina IL-12 e são caracterizadas pela secreção de citocinas com ação pró-inflamatória, como IFN- γ e TNF- α . As células Th2, inicialmente descritas como desencadeadoras de resposta anti-inflamatória devido sua habilidade de suprimir a resposta Th1, estão envolvidas na resposta imune humoral, agindo especialmente contra parasitas e alérgenos. Esse subtipo celular pode ser induzido pela secreção de IL-4, bem como pode secretar essa citocina, além de outras como IL-5, IL-13, IL-10. Os linfócitos Th17 desencadeiam respostas inflamatórias e estão envolvidos nas doenças autoimunes, na defesa contra bactérias extracelulares, fungos, e outros patógenos. A IL-6 é uma das citocinas envolvidas na diferenciação de células T *naive* em Th17, as quais podem secretar IL-17, IL-21, entre outras citocinas. Já as células Treg, que podem ser induzidas pela secreção de TGF- β , desenvolvem uma função supressora e reguladora da resposta imune, sendo importantes no controle de condições inflamatórias e doenças autoimunes. Células Treg, assim como as Th2, são secretoras de IL-10, citocina com ação anti-inflamatória e desativadora da resposta imunológica, sendo também capaz de ativar células B e aumentar a produção de anticorpos, conforme revisado por Raphael *et al.* (2015). Além disso, a IL-10 também pode regular a função das células Treg (Kubo & Motomura, 2012) e estimular a expansão de células Th2 (Martinez *et al.*, 2008).

Portanto, os monócitos são células essenciais no desenvolvimento da resposta imune, pois além de constituírem a primeira linha de defesa do hospedeiro, promovendo a resposta

inespecífica, eles direcionam para respostas imunes adquiridas apropriadas (Hume, 2015). Neste trabalho, monócitos foram adotados em nosso modelo experimental por serem células circulantes, e pelo fato de a própolis ser distribuída sistemicamente após sua ingestão.

3. Autofagia

A palavra autofagia é derivada do grego: *auto* significa próprio e *phagia* comer, ou seja, “comer a si mesmo”, referindo-se ao processo de degradação de estruturas citoplasmáticas da própria célula. Dessa forma, a autofagia consiste em uma via catabólica em que estruturas citoplasmáticas são degradadas dentro do lisossomo. Os processos autofágicos podem ser classificados em: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia (Ravikumar *et al.*, 2010). Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas citosólicas são translocadas para dentro do lisossomo através de um processo que envolve o reconhecimento por chaperonas e a entrega de proteínas ao receptor LAMP-2A, presente na membrana lisossomal. Na microautofagia, conteúdos citosólicos são incorporados diretamente no lúmen lisossomal por meio de invaginações da membrana do lisossomo (Valdor & Macian, 2012). Já a macroautofagia, comumente denominada apenas pelo termo autofagia (Ravikumar *et al.*, 2010), inicia-se com a formação de uma membrana, denominada de fagóforo, que internaliza proteínas, organelas ou patógenos a serem degradados (Van Limbergen *et al.*, 2009). Essa membrana pode ser originada de outras membranas intracelulares, como, por exemplo, a do retículo endoplasmático e da mitocôndria. Posteriormente, o fagóforo se alonga e suas extremidades se fundem, originando uma estrutura fechada de dupla membrana, denominada autofagossomo (Ravikumar *et al.*, 2010). O autofagossomo então se funde com o lisossomo, formando o autofagolisossomo, culminando com a degradação do seu conteúdo pelas enzimas lisossomais (Van Limbergen *et al.*, 2009)

A autofagia é mediada por um conjunto de proteínas que controlam os processos envolvidos desde a formação do fagóforo até a fusão com o lisossomo. Dentre elas, temos a beclin-1, cujo gene foi o primeiro relacionado à autofagia identificado em mamíferos (Van Limbergen *et al.*, 2009). A beclin-1 faz parte de um complexo que, quando ativado, resulta na formação do autofagossomo (Ravikumar *et al.*, 2010), sendo considerada um fator chave na indução da autofagia (Deretic, 2011). Outra proteína considerada essencial para a autofagia é a LC3, a qual, sob indução, é clivada gerando LC3-I (Glick *et al.*, 2010). A forma LC3-I,

presente no citosol, é posteriormente processada e convertida em LC3-II, e é a forma encontrada na membrana do autofagossomo. A LC3-II permanece no autofagossomo maduro até sua fusão com o lisossomo, quando é então desligada ou degradada. Devido a especificidade da associação dessa proteína com o autofagossomo, a quantificação de LC3-II é considerada um excelente marcador para avaliação da autofagia (Ravikumar *et al.*, 2010).

A autofagia exerce importante papel na manutenção da homeostasia celular, eliminando estruturas danificadas, reciclando componentes celulares, além de ser um mecanismo alternativo para obtenção de energia na ausência prolongada de nutrientes (Valdor & Macian, 2012). Participa também da resposta imunológica, regulando tanto a imunidade inata, quanto adaptativa (Deretic, 2011). É modulada por diferentes citocinas, bem como pode ser ativada após a detecção de PAMPs (Deretic & Levine, 2009), sendo que a ativação de receptores TLR é um dos mecanismos capaz de induzir a autofagia (Xu *et al.*, 2007; Delgado & Deretic, 2009). Também é especialmente importante para captura de estruturas localizadas no citosol da célula, auxiliando na eliminação de micro-organismos intracelulares (Deretic & Levine, 2009). Mantegazza *et al.* (2013) descreveram a autofagia como uma “segunda oportunidade” para geração de peptídeos para o MHC-II, uma vez que muitas bactérias fagocitadas ejetam fatores de virulência para fora do fagossomo, e algumas delas possuem a habilidade de escapar do fagossomo no intuito de evitar sua degradação, ficando expostas no citosol da célula. Assim, os antígenos presentes no citosol dependem do tráfego da autofagia para acessarem o compartimento do MHC-II, evidenciando a contribuição da autofagia para a apresentação antigênica (Mintern & Villadangos, 2012). Portanto, a autofagia é um processo crucial para manutenção da sobrevivência celular em diversas condições biológicas, como também nos processos infecciosos (Ravikumar *et al.*, 2010).

4. Antígenos utilizados neste projeto

4.1. Ácido retinóico

O ácido retinóico (AR), produto da metabolização da vitamina A, é conhecido por exercer papel marcante na proliferação e diferenciação celular, atuando na modulação do sistema imunológico (Pino-Lagos *et al.*, 2010). Essa ação imunomoduladora é comprovada por estudos que relatam que a deficiência de vitamina A está correlacionada a defeitos na

atividade de células T *helper* (Mora *et al.*, 2008). Sugere-se que o AR estabeleça um ambiente não-inflamatório, principalmente pela indução de células T reguladoras (Pino-Lagos *et al.*, 2010). Sob condições inflamatórias o AR é capaz de sustentar a expressão de Foxp3, fator importante na regulação das Tregs, impedindo sua conversão em células Th1 e Th17, responsáveis pelo desenvolvimento de respostas inflamatórias (Lu *et al.*, 2014). Pesquisas conduzidas em modelo animal têm relatado a eficácia do AR no tratamento de doenças autoimunes, como esclerose múltipla, lúpus sistêmico e artrite (Yang *et al.*, 2015).

4.2. Subunidade B da Enterotoxina Termolábel de *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa que faz parte da microbiota intestinal, sendo normalmente inofensiva ao homem. No entanto, pode também apresentar caráter patogênico, causando uma variedade de complicações, como infecções gastrointestinais, do trato urinário, do sistema nervoso central e até septicemia. Podem ser classificadas em *E. coli* extra-intestinal (ExPEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC) e difusamente aderente (DAEC), as quais compartilham muitos fatores de virulência. A ETEC compreende a causa mais comum da infecção conhecida como “diarreia do viajante”, que pode ser fatal quando acomete crianças menores de 5 anos, e é mediada pela secreção de enterotoxinas estáveis ao calor e termolábeis. A enterotoxina termolábel apresenta em sua estrutura uma subunidade A e cinco subunidades B. A subunidade B da enterotoxina termolábel (EtxB) é a responsável por se ligar ao receptor GM1, presente na célula de mamíferos, levando a internalização da toxina para o citosol da célula, conforme revisado pelos autores Croxen & Finlay (2010). A EtxB é documentada por seu papel na ativação da resposta imune, sendo descrita por apresentar potente atividade adjuvante, com capacidade de suprimir respostas Th1 e induzir ativação de células B (Turcanu *et al.*, 2002).

4.3. Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS), também chamado de endotoxina, é o principal componente presente na superfície de bactérias gram-negativas, recobrando mais de 90% da

célula bacteriana. O LPS constitui uma barreira física para proteção das bactérias a agentes antimicrobianos, ao mesmo tempo que representa um ativador da resposta imune, sendo reconhecido pelos receptores (TLRs) presentes em células da imunidade inata, e levando ao desenvolvimento de respostas pró-inflamatórias (Rosenfeld & Shai, 2006). Os monócitos circulantes reconhecem o LPS, podendo levar a produção de grandes quantidades de IL-1 β e IL-6, auxiliando a diferenciação de células Th17, ao passo que as produtoras de IL-12 falham em desenvolver essa resposta (Gálvez, 2014). Caucheteux *et al.* (2016) observaram que a imunização intranasal com LPS é capaz de estimular a produção de IL-1 β e IL-6 por macrófagos e IL-23 por DCs alveolares, favorecendo respostas Th17. Também Arnold *et al.* (2015) demonstraram que macrófagos estimulados com LPS são eficientes em estimular respostas Th17.

4.4. *Melanoma-associated antigen 1 (MAGE-1)*

O *Melanoma-associated antigen 1 (MAGE-1)* é um antígeno expresso em muitos melanomas humanos e também em outros tipos de tumor, mas que não é expresso em tecidos normais (Büeler & Mulligan, 1996). Dessa forma, o MAGE faz parte de um grupo chamado de antígenos associados a tumores, que apresentam expressão aberrante em vários tipos de câncer (Kulkarni *et al.*, 2012). Devido a alta especificidade tumoral desse antígeno, ele tornou-se alvo para a imunoterapia contra o câncer e diversas pesquisas têm sido desenvolvidas nesse sentido (Büeler & Mulligan, 1996). Resultados obtidos na década de 90 já demonstravam a eficácia do MAGE-1 nessa terapia. No estudo de Mukherji *et al.* (1995), pacientes com melanoma metastático avançado receberam a vacina de APCs autólogas pulsadas com peptídeos sintéticos de MAGE-1 e desenvolveram linfócitos T citotóxicos específicos ao MAGE-1. Mais tarde, Chaux *et al.* (2001) demonstraram que peptídeos de MAGE-1 são também reconhecidos por células TCD4⁺, demonstrando a importância das APCs no sítio tumoral, as quais são capazes de reconhecer, processar e apresentar o antígeno aos linfócitos, além de sustentar a ativação e proliferação de células T citotóxicas específicas ao tumor. Dessa forma, os peptídeos do MAGE-1 podem ser apresentados em moléculas de HLA classe I ou II, podendo ativar tanto células TCD8⁺ quanto TCD4⁺. De Lastic *et al.* (2016), em ensaios conduzidos *in vitro*, simularam a apresentação de antígeno do peptídeo

MAGE-3 e observaram uma forte polarização das células TCD4⁺ para o perfil Th1 – tipo de resposta importante no combate a antígenos tumorais.

5. Justificativa do trabalho

Diante destas observações, o presente projeto foi delineado visando avaliar a ação moduladora da própolis nos mecanismos envolvidos na apresentação antigênica. Para tal, utilizamos um antígeno de origem infecciosa (subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* - EtxB) (Norton *et al.*, 2012), um antígeno tumoral (*human* MAGE-1) identificado em melanoma e outros tipos de tumores e alvo para imunoterapia de câncer (Büeler & Mulligan, 1996); o ácido retinóico, metabólito da vitamina A que impede a conversão das células Tregs em Th1 ou Th17 (Lu *et al.*, 2014), e lipopolissacarídeo (LPS) (Gálvez, 2014), no intuito de investigar se a própolis poderia favorecer um perfil preferencial de resposta. Ademais, visamos avaliar se a própolis poderia modular o processo de autofagia, como uma forma alternativa de apresentação antigênica, utilizando para isso a rapamicina – um estímulo indutor de autofagia.

Assim, visamos investigar a hipótese de que a apresentação antigênica poderia ser modulada pela própolis, culminando, por exemplo, na resposta imune celular a tumores, ou humoral contra antígenos extracelulares, ou reguladora, em função do perfil de resposta gerada (Th1, Th2, Th17 ou Treg), com o intuito de futuramente adotar tais protocolos em esquemas vacinais, em terapias antitumorais, no tratamento de infecções, doenças auto-imunes, entre outros, evidenciando assim a implicação prática desta pesquisa.

Este projeto é parte de um projeto de pesquisa subvencionado pela FAPESP (Processo 2015/03493-3), que conta com 2 pós-doutorandos de nosso grupo, que estão analisando, em projetos paralelos, os perfis de linfócitos após interação com monócitos incubados com os mesmos antígenos, na presença ou não de própolis. Os dados obtidos em conjunto permitirão a análise dos efeitos da própolis na modulação da apresentação antigênica e ativação diferencial de linfócitos T.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a possível ação moduladora da própolis nos mecanismos envolvidos na apresentação de antígenos por monócitos humanos estimulados com AR, EtxB, LPS e MAGE-1; e na autofagia, por monócitos humanos estimulados com rapamicina.

Objetivos específicos

Verificar em monócitos de indivíduos saudáveis incubados com própolis, simultaneamente ou não com os estímulos:

- O possível efeito citotóxico dos tratamentos, pelo método do MTT;
- A expressão de marcadores de superfície celular (TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD40 e CD80), por citometria de fluxo;
- A produção de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12), por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- A expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à autofagia (Beclin-1 e LC3-II) pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Material e Métodos

1. Obtenção da amostra de própolis e antígenos

A própolis foi produzida por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), no apiário da Fazenda Experimental Lageado, (UNESP, Campus de Botucatu). As amostras foram obtidas de telas propolisadoras e congeladas para facilitar a remoção da própolis. Em seguida, a própolis foi triturada e extraída (30 g de própolis para 100 mL de etanol 70%), em ausência de luz e sob moderada agitação. Após 7 dias, os extratos foram filtrados e foi calculada a concentração final, para obtenção do peso seco da solução (110 mg/mL) (Sforcin *et al.*, 2005).

A própolis foi diluída em meio RPMI completo (Cultilab, Brasil), 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 (Cultilab, Brasil). Após filtração em membrana de 0,22 µm, foram realizadas diluições para se obter as concentrações de 5 e 25 µg/mL de própolis. O mesmo procedimento foi realizado com o álcool 70%, solvente da própolis, para se obter 0,15% de álcool (volume correspondente ao teor de álcool 70% na maior concentração de própolis utilizada – 25 µg/mL).

A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, EUA) foi diluída em água ultrapura, e posteriormente as concentrações foram ajustadas para 2 e 10 µg/mL em meio RPMI completo. O antígeno tumoral MAGE-1 *human recombinant* (Enzo Life Science, EUA) foi diluído em meio RPMI completo para obtenção das concentrações 2 e 10 µg/mL. O ácido retinóico (Cayman Chemical, EUA) foi diluído em DMSO, e em seguida ajustada as concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} M em meio RPMI completo. O antígeno LPS, de *E. coli* - sorotipo 026:B6 (Sigma-Aldrich, EUA) foi diluído em meio RPMI completo para obter as concentrações de 1 e 5 µg/mL. Também foram realizadas incubações com os solventes dos antígenos (água ultrapura e DMSO), na proporção em que foram utilizados nas diluições. As concentrações utilizadas neste trabalho foram escolhidas com base na literatura pertinente e após a realização de experimentos pilotos.

2. Obtenção de monócitos humanos

As amostras de sangue foram obtidas de 5 indivíduos voluntários saudáveis, que assinaram um termo de consentimento para retirada do sangue, dando ciência desta pesquisa (Anexo 1). Participaram somente indivíduos acima de 18 anos, não fumantes e que não estavam doentes e nem utilizando medicação de espécie alguma na época da coleta. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CAAE: 42600915.0.0000.5411).

Foram coletados 20 mL de sangue total e dispensados em tubos estéreis contendo 200 µL de heparina. Posteriormente, os monócitos foram obtidos por separação em gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) através de centrifugação e o anel rico em células mononucleares foi coletado e lavado 2 vezes em meio RPMI por 10 minutos a 200 x g. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspendido em 1 mL de RPMI completo. A identificação e viabilidade dos monócitos foram realizadas por meio da incorporação de vermelho neutro a 0,02% durante 8 minutos a 37°C. Após contagem em câmara de Neubauer, a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células/mL, que foram posteriormente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 90 min para aderência dos monócitos. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes foram incubadas com própolis, simultaneamente ou não com a enterotoxina de *E. coli*, MAGE-1, ácido retinóico e LPS por 24 h. Ou incubados com própolis, simultaneamente ou não com Rapamicina por 4 h (Figura 1, 2 e 3).

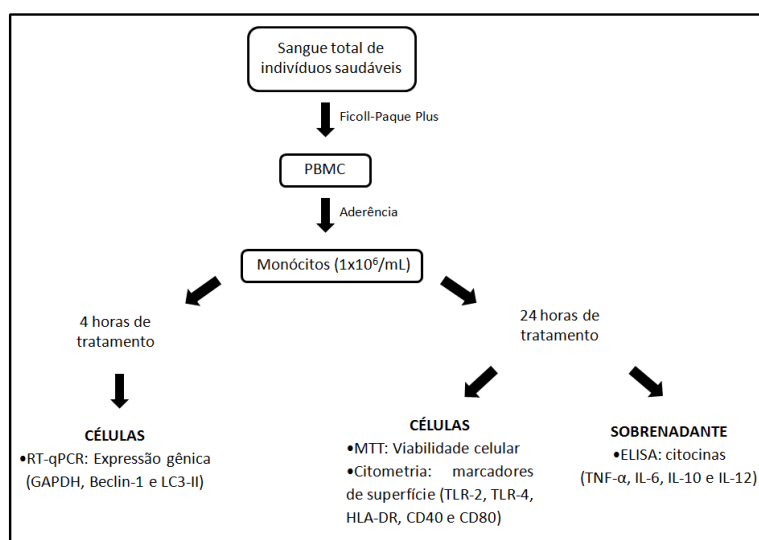


Figura 1. Fluxograma dos experimentos.

C	Controle (meio de cultura)
P5	Própolis 5 µg/mL
P25	Própolis 25 µg/mL

A1	Ácido retinóico 10 ⁻⁸ M	E2	EtxB 2 µg/mL
A1P5	Ácido retinóico 10 ⁻⁸ M + Própolis 5 µg/mL	E2P5	EtxB 2 µg/mL + Própolis 5 µg/mL
A1P25	Ácido retinóico 10 ⁻⁸ M + Própolis 25 µg/mL	E2P25	EtxB 2 µg/mL + Própolis 25 µg/mL
A2	Ácido retinóico 10 ⁻⁷ M	E10	EtxB 10 µg/mL
A2P5	Ácido retinóico 10 ⁻⁷ M + Própolis 5 µg/mL	E10P5	EtxB 10 µg/mL + Própolis 5 µg/mL
A2P25	Ácido retinóico 10 ⁻⁷ M + Própolis 25 µg/mL	E10P25	EtxB 10 µg/mL + Própolis 25 µg/mL

L1	LPS 1 µg/mL	M2	MAGE 2 µg/mL
L1P5	LPS 1 µg/mL + Própolis 5 µg/mL	M2P5	MAGE 2 µg/mL + Própolis 5 µg/mL
L1P25	LPS 1 µg/mL + Própolis 25 µg/mL	M2P25	MAGE 2 µg/mL + Própolis 25 µg/mL
L5	LPS 5 µg/mL	M10	MAGE 10 µg/mL
L5P5	LPS 5 µg/mL + Própolis 5 µg/mL	M10P5	MAGE 10 µg/mL + Própolis 5 µg/mL
L5P25	LPS 5 µg/mL + Própolis 25 µg/mL	M10P25	MAGE 10 µg/mL + Própolis 25 µg/mL

Figura 2. Tratamento dos monócitos para os testes de viabilidade celular (MTT), expressão de marcadores de superfície (citometria de fluxo) e produção de citocinas (ELISA).

C	Controle
P	Própolis (25 µg/mL)
P+R	Própolis (25 µg/mL) + Rapamicina (800 nM)
R	Rapamicina (800 nM)

Figura 3. Tratamento dos monócitos para o teste de autofagia (RT-qPCR).

3. Viabilidade de monócitos humanos após incubação com própolis e antígenos

Cem microlitros contendo 1×10^5 células foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços, incubando-se a 37°C sob pressão constante de 5% de CO₂ por 24 h, na presença da própolis, simultaneamente ou não com os antígenos. Células controle foram incubadas somente com meio de cultura. A viabilidade celular foi analisada através método de redução pelo MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma-Aldrich, EUA). Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante da cultura e adicionou-se 100 µL do MTT na concentração de 1 mg/mL em meio RPMI completo, incubando novamente as células por mais 3 horas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionado aos poços 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, a

absorbância correspondente a cada amostra foi obtida em leitor de ELISA, utilizando-se o filtro de 540 nm. A absorbância obtida das células controle (não tratadas) foi considerada como 100% de viabilidade celular.

4. Cultura de monócitos para avaliação de marcadores de superfície celular e dosagem das citocinas

As culturas de monócitos, contendo 1×10^6 células/mL, foram incubadas com a própolis e com os antígenos por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas, e as células foram utilizadas para avaliação dos marcadores de superfície.

4.1. Avaliação de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo

Nos ensaios de citometria de fluxo, utilizamos o citômetro de fluxo modelo FACS Calibur™ (Becton Dickinson, EUA).

Para avaliação da presença dos seguintes marcadores celulares: TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD80 e CD40, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram distribuídas em tubos de poliestireno para citômetro (BD Labware, EUA) e centrifugadas por 10 minutos a $200 \times g$. O sobrenadante foi descartado e as culturas foram incubadas por 24 h a 37°C com a própolis simultaneamente ou não com os antígenos. Após esse período, as células foram lavadas, ressuspensas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II) e incubadas com os anticorpos monoclonais fluoresceinados específicos.

As células foram separadas em dois grupos (A e B). No grupo A, as células foram incubadas com 5 μL do anticorpo anti-HLA-DR conjugado com FITC (clone L243 - Biolegend, EUA), 1,5 μL de anti-CD80 conjugado com PE (clone D210 - Biolegend, EUA) e 1 μL de anti-CD40 conjugado com APC (clone 5C3 - Biolegend, EUA). No grupo B, os monócitos foram incubados com 0,6 μL dos anticorpos anti-TLR-2 conjugado com FITC (clone TL2.1 - Biolegend, EUA) e 1,25 μL de anti-TLR-4 conjugado com PE (clone HTA125 - Biolegend, EUA). Todas as células foram marcadas com 0,5 μL anti-CD14 conjugado com PerCP/Cy5.5 (clone HCD14 - Biolegend, EUA), o que permitiu a seleção do *gate* apenas dos monócitos CD14^+ , e incubadas durante 30 minutos ao abrigo da luz a 4°C . Para cada teste, foi

incluído um tubo controle onde as células foram incubadas com os anticorpos de controle isotípico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes.

Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 200 x g para lavagem, fixadas em 450 µL de ISOTON II contendo 50 µL de paraformaldeído 5% e analisadas por citometria de fluxo.

As análises foram realizadas utilizando o *software CellQuest* e foi padronizada a aquisição de 15.000 eventos (no *gate*) por amostra, a população de interesse foi estabelecida com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Os resultados foram expressos em percentual de células CD14 positivas.

4.2. Quantificação da produção de citocinas pela técnica de ELISA

A determinação da concentração de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12 foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). 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 (Nunc/Apogent, Thermo Fisher Scientific, EUA), e incubadas overnight a 4°C em câmara úmida. Após 3 lavagens dos poços com PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), foi realizado o bloqueio dos poços com albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS (10%) para saturação dos sítios de ligação e, em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, foi realizada nova sequência de lavagens, e alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes das culturas de células foram adicionadas, seguida de incubação por 2 h a temperatura ambiente. Após esse período e realização de novas lavagens, foram adicionados 100 µL de anticorpo policlonal, com incubação por 2 h. Em seguida, os poços foram novamente lavados e, ao anticorpo de detecção policlonal biotilado, foi adicionado o conjugado estreptoavidina-peroxidase, incubando-se novamente por 20 minutos ao abrigo da luz. Novas lavagens foram realizadas e, para revelação, foram adicionados 100 µL da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina. Após 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

5. Avaliação da expressão de transcritos relacionados à autofagia

Os monócitos, obtidos de doadores saudáveis, foram incubados com própolis (25 µg/mL) e rapamicina (InLab, Brasil) (800 nM), isoladamente ou em combinação. Após o tratamento, as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4 h e posteriormente submetidos à análise da expressão dos genes que codificam as proteínas Beclin-1 e LC3-II, conforme descrito na tabela 1. O RNA total dos monócitos foi extraído utilizando o reagente Trizol (Sigma-Aldrich, EUA), conforme protocolo do fabricante. Após a extração, a fim de garantir a completa remoção de DNA genômico, o RNA total foi incubado com DNase livre de RNase (Promega, EUA). A quantificação de RNA das amostras obtidas foi determinada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) para execução da Reação em Cadeia da Polimerase acoplada a transcrição reversa (*Reverse Transcription-coupled Polymerase Chain Reaction – RT-PCR*), utilizando o *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems, EUA), conforme instruções do fabricante.

A quantificação da expressão gênica foi realizada pela técnica de RT-qPCR utilizando GoTaq® RT-qPCR *Master Mix* (Promega, USA) e o aparelho 7500 *Fast Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, USA).

As variantes dos alvos estudados foram alinhadas no programa MEGA 5.1 e, posteriormente, cada iniciador foi escolhido por meio do programa Primer-BLAST. As sequências dos iniciadores utilizadas no presente estudo estão detalhadas na tabela 1.

As reações continham 0,4 µL dos iniciadores (*forward e reverse*), 2 µL de cDNA, 10 µL de GoTaq e 7,2 µL de água livre de nuclease, totalizando 20 µL por reação. Adicionalmente foi incluído um controle a fim de provar a ausência de contaminação. As condições para a reação de RT-qPCR foram: desnaturação inicial a 96°C-2 min e 40 ciclos a 95°C – 15 s e 60°C – 60 s, seguido de uma curva *melting*. A amplificação de cada transcrito específico foi confirmada pelo perfil da curva *melting* gerada no final de cada reação.

Os valores de expressão dos transcritos analisados foram normalizados com base na análise concomitante da expressão do gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O cálculo da expressão diferencial dos genes selecionados foi realizado através do método de processamento de dados em relação a uma curva padrão (Larionov *et al.*, 2005). Para análise da expressão relativa, após a análise da expressão gênica,

escolheu-se uma amostra de RNA que recebeu o valor relativo de 100, e as demais amostras receberam valores relativos a esta amostra de referência.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores para a análise da expressão gênica

Alvo	Sequência (5'-3')	Comprimento do produto	Nome do gene	Acesso ao GenBank
Beclin-1	<p><i>Forward primer:</i> (101)GTAGACCGGACTTGGGTGAC(120)</p> <p><i>Reverse primer:</i> (198)CATGGTGCTGTTGTTGGACG(179)</p>	98 pb	<i>BECN1</i>	NM_003766.3
LC3-II	<p><i>Forward primer:</i> (517)CCAGGAAACCTTCGGCTTCT(536)</p> <p><i>Reverse primer:</i> (632)CGGTAGAGGCAGCTCAGTTC(613)</p>	116 pb	<i>MPILC3A</i>	NM_032514.3
GAPDH	<p><i>Forward primer:</i> (684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)</p> <p><i>Reverse primer:</i> (801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)</p>	118 pb	<i>GAPDH</i>	NM_002046.4

6. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software Graph Pad Prism 5 (GraphPad, USA) utilizando Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett ($P < 0,05$). Os dados estão apresentados como média e desvio padrão.

Resultados e Discussão

1. Viabilidade celular

O ensaio de MTT consiste em um método colorimétrico utilizado para quantificação de células viáveis, que se baseia na redução do sal MTT em formazan – reação executada pelas enzimas mitocondriais de células viáveis. Assim, a quantidade do sal de formazan, medida espectrofotometricamente, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Ferrari *et al.*, 1990). Os resultados desse ensaio estão dispostos na figura 4.

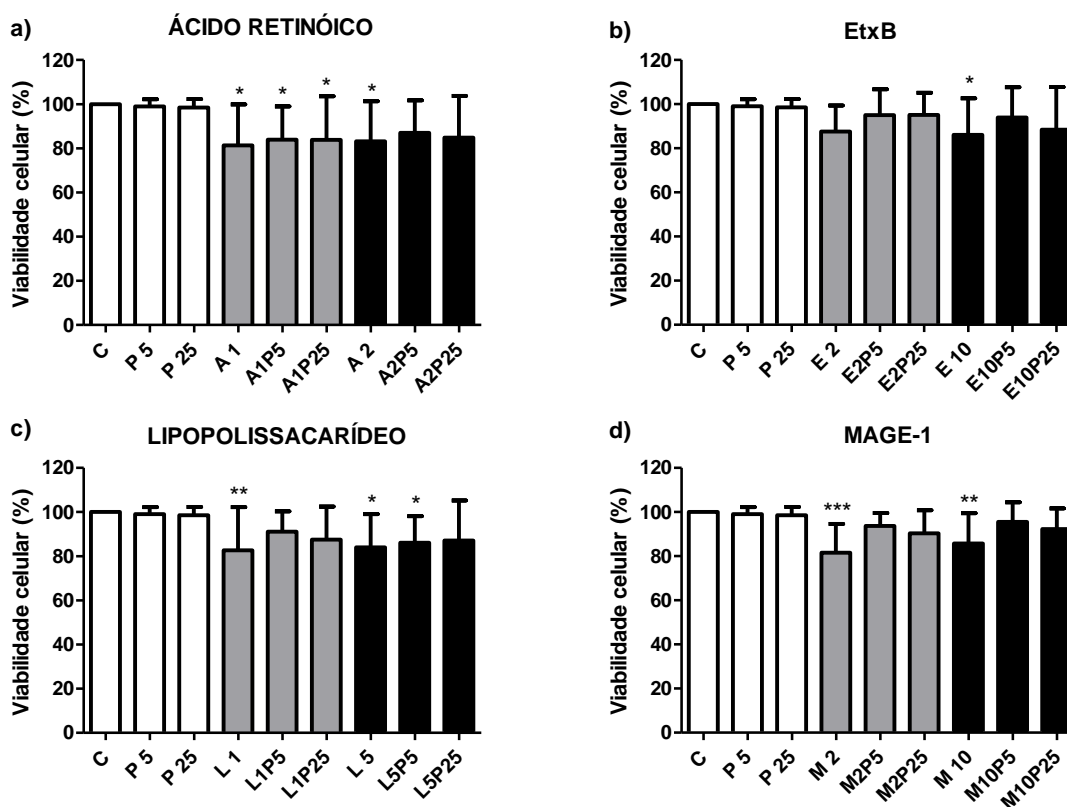


Figura 4. Viabilidade (%) de monócitos humanos (1×10^6 células/mL) após 24 h de tratamento com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), antígenos: **a)** ácido retinóico (A - 10^{-8} e 10^{-7} M), **b)** EtxB (E - 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$), **c)** LPS (L – 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$), **d)** MAGE (M - 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e associação entre os antígenos e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam a média e desvio-padrão ($n = 5$). Significativamente diferente do controle: *($P < 0,05$), **($P < 0,001$) e ***($P < 0,0001$).

A viabilidade dos monócitos não foi afetada após a incubação com a própolis, bem como após a incubação com seu solvente – etanol 70% (dado não mostrado). Outros autores, utilizando a mesma amostra, também observaram ausência de efeito citotóxico da própolis e de seu diluente sobre monócitos humanos. Conti *et al.* (2015) e Santiago *et al.* (2016) observaram que diferentes concentrações, variando de 0,2 a 20 µg/mL, não afetaram a viabilidade de monócitos humanos. O mesmo foi observado por Cardoso *et al.* (2017), utilizando a concentração de 20 µg/mL, e por Búfalo *et al.* (2014) utilizando concentrações até 100 µg/mL, incluindo as utilizadas nesse trabalho (5 e 25 µg/mL).

Em relação ao AR, ambas concentrações reduziram ligeiramente a viabilidade das células, ao passo que a associação do AR 10^{-7} M à própolis (A2P5 e A2P25) foi semelhante ao controle, demonstrando que a própolis protegeu as células do efeito do AR. O DMSO, utilizado para diluição do AR, não afetou a viabilidade dos monócitos (dado não mostrado).

A EtxB, reduziu a viabilidade dos monócitos somente na concentração de 10 µg/mL (E10). Já sua associação a ambas concentrações de própolis não foi citotóxica. A água ultrapura, solvente do antígeno, também não afetou a viabilidade das células (dado não mostrado). Turcanu *et al.* (2002) observaram que o tratamento com EtxB, em diferentes concentrações (0,3, 1, 3, 10 e 33 µg/mL), não altera a viabilidade de monócitos humanos.

O LPS afetou a viabilidade nas duas concentrações utilizadas. A associação com a própolis obteve porcentagem de células viáveis similares ao controle, exceto LPS 5 µg/mL com própolis 5 µg/mL (L5P5). Em outros estudos, o LPS, mesmo em maiores concentrações, não apresentou efeito citotóxico em monócitos humanos (Cardoso *et al.*, 2017) e DCs (Conti *et al.*, 2016).

O antígeno tumoral MAGE-1 reduziu a viabilidade das células em ambas concentrações utilizadas, e sua associação com a própolis apresentou porcentagem similar ao controle, demonstrando que a ocorrência de morte celular é efeito somente do MAGE-1.

Embora as concentrações dos antígenos estudados tenham acarretado diminuição na viabilidade de monócitos, a média da viabilidade foi superior a 80% em todos os tratamentos, o que é considerado um valor representativo para os testes biológicos (Kong *et al.*, 2008). Além disso, nossos dados sugerem que a própolis exerceu um efeito citoprotetor para todos os antígenos, reduzindo a ocorrência de morte celular causada pelos mesmos, o que nos levou a continuar os ensaios com essas concentrações.

2. Expressão de marcadores de superfície celular

Os receptores de superfície celular presentes em monócitos são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada. Assim, avaliamos a expressão dos marcadores de superfície celular TLR-2, TLR-4, CD40, CD80 e HLA-DR em monócitos humanos, após incubação com os diferentes antígenos, associados ou não a própolis.

Os resultados da expressão dos referidos marcadores em monócitos humanos estimulados com AR, simultaneamente ou não a própolis, estão dispostos na figura 5.

ÁCIDO RETINÓICO

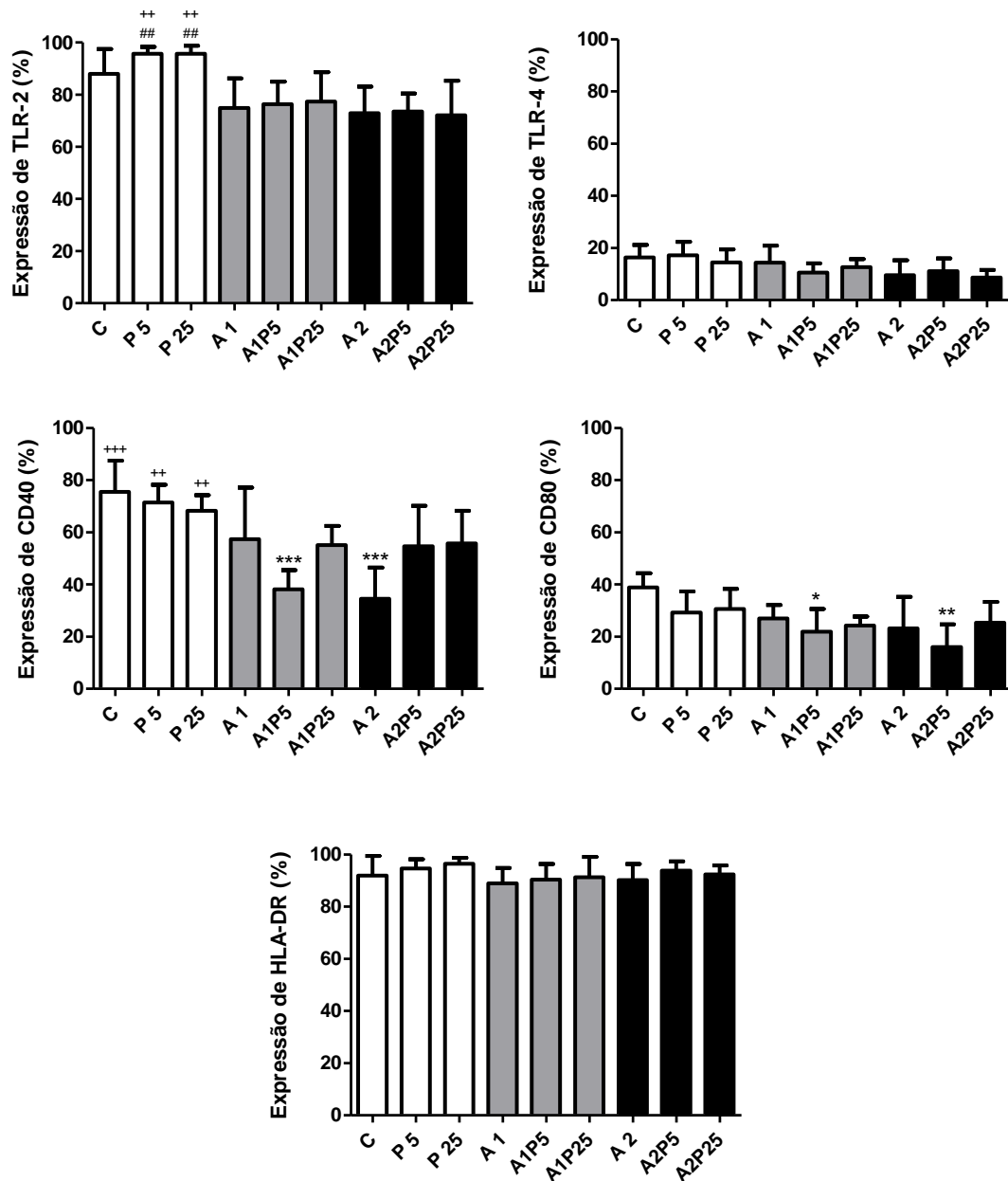


Figura 5. Frequência (%) de monócitos humanos (1×10^6 células/mL) que expressam TLR-2, TLR-4, CD40, CD80 e HLA-DR incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), ácido retinóico (A - 10^{-8} e 10^{-7} M) e associação entre o ácido retinóico e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle (C): * ($P < 0,05$); ** ($P < 0,001$); *** ($P < 0,0001$). Significativamente diferente do ácido retinóico 10^{-8} M (A1): ## ($P < 0,001$). Significativamente diferente do ácido retinóico 10^{-7} M (A2): ++ ($P < 0,001$); +++ ($P < 0,0001$)

Em relação ao TLR-2, o AR diminuiu a expressão do receptor que foi induzida pela própolis. Liu *et al.* (2005), observaram que o tratamento de monócitos humanos com AR reduziu a expressão de TLR-2, mas não de TLR-4. Posteriormente, eles observaram que o pré-tratamento das células com AR, seguida da estimulação com um ligante de TLR-2, reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-12, que foram induzidas pelo ligante de TLR-2 (observadas na cultura de células não tratadas com AR), demonstrando que o AR modula a expressão e também a ativação desse receptor. Assim, os autores descrevem que, embora a ativação do TLR seja essencial para a defesa contra patógenos, ela pode resultar em inflamação e dano tecidual, sugerindo que um dos mecanismos pelo qual o AR possa exercer seu efeito anti-inflamatório seja por afetar a expressão e função de TLR-2. De acordo com nossos resultados, a própolis associada ao AR parece manter essa função supressora sob o TLR-2, contribuindo com a resposta mediada pelo AR. Já a expressão de TLR-4 não foi alterada pelo AR, própolis e associações.

Em relação às moléculas coestimulatórias, o AR (A2) e uma das associações (A1P5) diminuíram a expressão de CD40. O AR, isoladamente, não alterou a expressão de CD80 (A1 e A2). Mohty *et al.* (2003), ao tratarem monócitos humanos com AR simultaneamente com GM-CSF, para geração de DCs, observaram que as novas células apresentaram expressão de CD40 e CD80 similar às DCs diferenciadas pelo tratamento convencional, demonstrando o perfil ativador dessa molécula. O tratamento de células THP-1 (linhagem tumoral monocítica de leucemia humana que mimetiza monócitos humanos) com AR e posteriormente com flagelina induziu expressão de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 e CD86, comparado às células que não receberam nenhum dos tratamentos (Cho *et al.*, 2011). Entretanto, associações de AR com a menor concentração de própolis (A1P5 e A2P5) acarretaram diminuição na expressão de CD80. Búfalo *et al.* (2014) demonstraram que a própolis é capaz de super-regular a expressão desse receptor em monócitos humanos somente em alta concentração (100 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando que o efeito imunomodulador da própolis é dependente da concentração utilizada.

Em relação a EtxB, os resultados da expressão dos marcadores de superfície em monócitos humanos estimulados com a toxina, simultaneamente ou não a própolis, estão presentes na figura 6.

EtxB

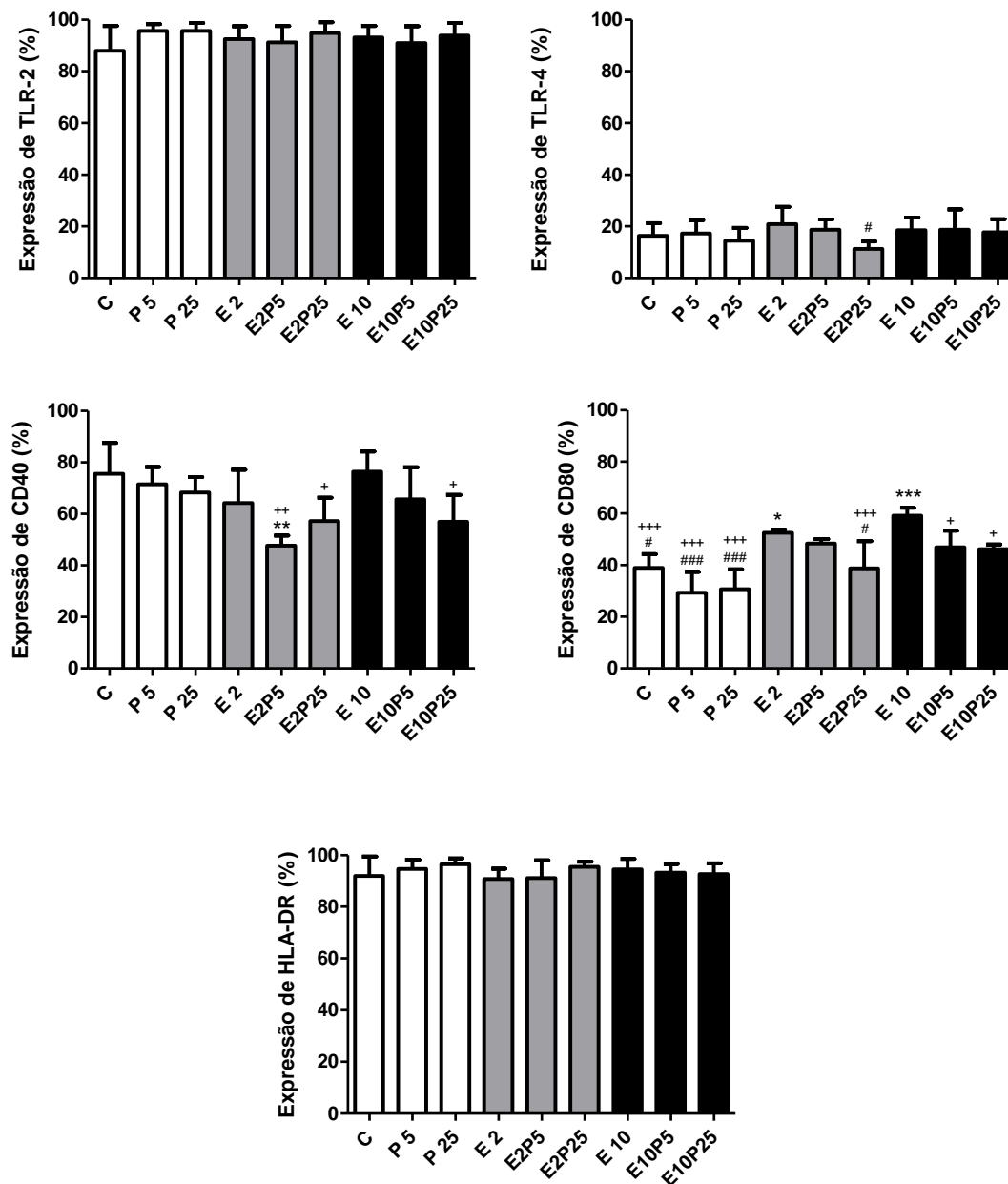


Figura 6. Frequência (%) de monócitos humanos (1×10^6 células/mL) que expressam TLR-2, TLR-4, CD40, CD80 e HLA-DR incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), EtxB (E - 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e associação entre a EtxB e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle (C): *($P < 0,05$); **($P < 0,001$); ***($P < 0,0001$). Significativamente diferente de EtxB 2 $\mu\text{g/mL}$ (E2): #($P < 0,05$); ###($P < 0,0001$). Significativamente diferente de EtxB 10 $\mu\text{g/mL}$ (E10): + ($P < 0,05$); ++ ($P < 0,001$); +++ ($P < 0,0001$).

A própolis associada a EtxB (E2P25) diminuiu a expressão de TLR-4 em relação a toxina sozinha (E2). No entanto, dados anteriormente obtidos por nosso grupo mostraram que a própolis, em menores concentrações, foi capaz de super-regular a expressão de TLR-4 em monócitos humanos (Búfalo *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016), indicando que essa modulação provavelmente seja dependente das concentrações de própolis e de antígeno. A expressão de TLR-2 não foi alterada pela EtxB, própolis e associações.

Nesse estudo, a EtxB induziu maior expressão de CD80 (E2 e E10), comparada ao basal e à própolis. Porém, Turcanu *et al.* (2002) descreveram que a habilidade da EtxB em ativar monócitos humanos não foi associada com alterações na expressão de diferentes receptores, dentre eles MHC II, CD40 e CD80, mas sim à sua capacidade de se ligar a outro receptor presente na superfície celular (GM1). Ao contrário, em células B, a toxina parece exercer um importante papel na expressão desses receptores, como demonstrado por Nashar *et al.* (1997), em que a EtxB super-regulou a expressão de MHC-II, CD25, CD40 e CD80, além da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Os autores concluem que a EtxB provavelmente atue ativando moléculas que são essenciais para diferenciação e manutenção da sobrevivência de linfócitos B, o que pode explicar o papel dessa toxina em estimular a produção de anticorpos. A associação da própolis à EtxB reduziu os níveis de expressão de CD40 (E10P25) e CD80 (E2P25, E10P5 e E10P25) induzidos pela toxina. O efeito inibitório que a própolis desencadeou na expressão de CD80 pode ser explicado, além da concentração utilizada, também pela presença do ácido cinâmico em nossa amostra, o qual já foi descrito por reduzir os níveis desse receptor (Conti *et al.*, 2013).

Os dados referentes à expressão dos marcadores em monócitos humanos estimulados com LPS, associados ou não a própolis, estão dispostos na figura 7.

LIPOPOLISSACARÍDEO

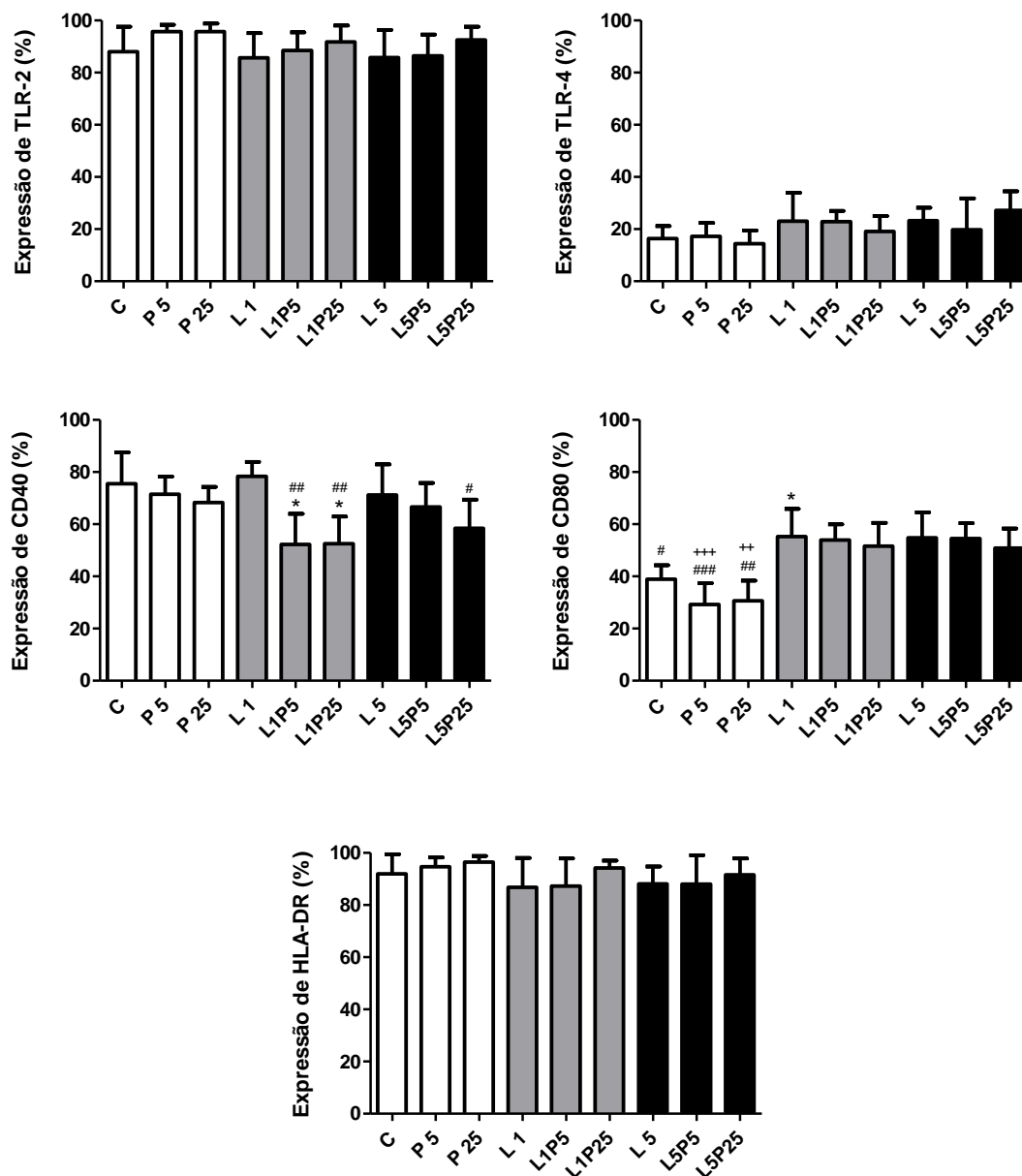


Figura 7. Frequência (%) de monócitos humanos (1×10^6 células/mL) que expressam TLR-2, TLR-4, CD40, CD80 e HLA-DR incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), LPS (L – 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$) e associação entre o LPS e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle (C): * ($P < 0,05$). Significativamente diferente do LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (L1): # ($P < 0,05$); ## ($P < 0,001$); ### ($P < 0,0001$). Significativamente diferente do LPS 5 $\mu\text{g/mL}$ (L5): ++ ($P < 0,001$); +++ ($P < 0,0001$).

Por ser um reconhecido ligante de TLR-4, esperava-se que o LPS pudesse aumentar a expressão do referido receptor. No entanto, a diversidade de TLRs entre os indivíduos é muito grande, sendo que os polimorfismos do gene TLR-4 humano é uma das melhores ilustrações desse processo. Um exemplo disso é que indivíduos portadores de determinados alelos são menos responsivos ao LPS, indicando que esse polimorfismo resulte em sinalização reduzida do TLR-4 (Miller *et al.*, 2005). A expressão de TLR-2 também não foi alterada pelo LPS, bem como pela própolis e as associações.

As associações de própolis ao LPS reduziram a expressão de CD40 (L1P5 e L1P25), comparado ao controle e ao LPS (L1) isoladamente. Quanto ao CD80, o LPS aumentou a expressão desse receptor, e a própolis manteve a ação induzida pelo LPS, embora isoladamente a própolis tenha induzido menor expressão de CD80. No estudo de Conti *et al.* (2016), DCs tratadas com própolis e LPS não mostraram alteração na expressão de ambos receptores, quando utilizada até a concentração de 20 µg/mL. Cardoso *et al.* (2017) também observaram que a própolis não altera a expressão de TLR-2, TLR-4, HLA-DR e CD80 que foi induzida pelo LPS.

Por fim, os resultados da expressão dos receptores de superfície em monócitos humanos incubados com MAGE-1, simultaneamente ou não a própolis, estão presentes na figura 8.

MAGE-1

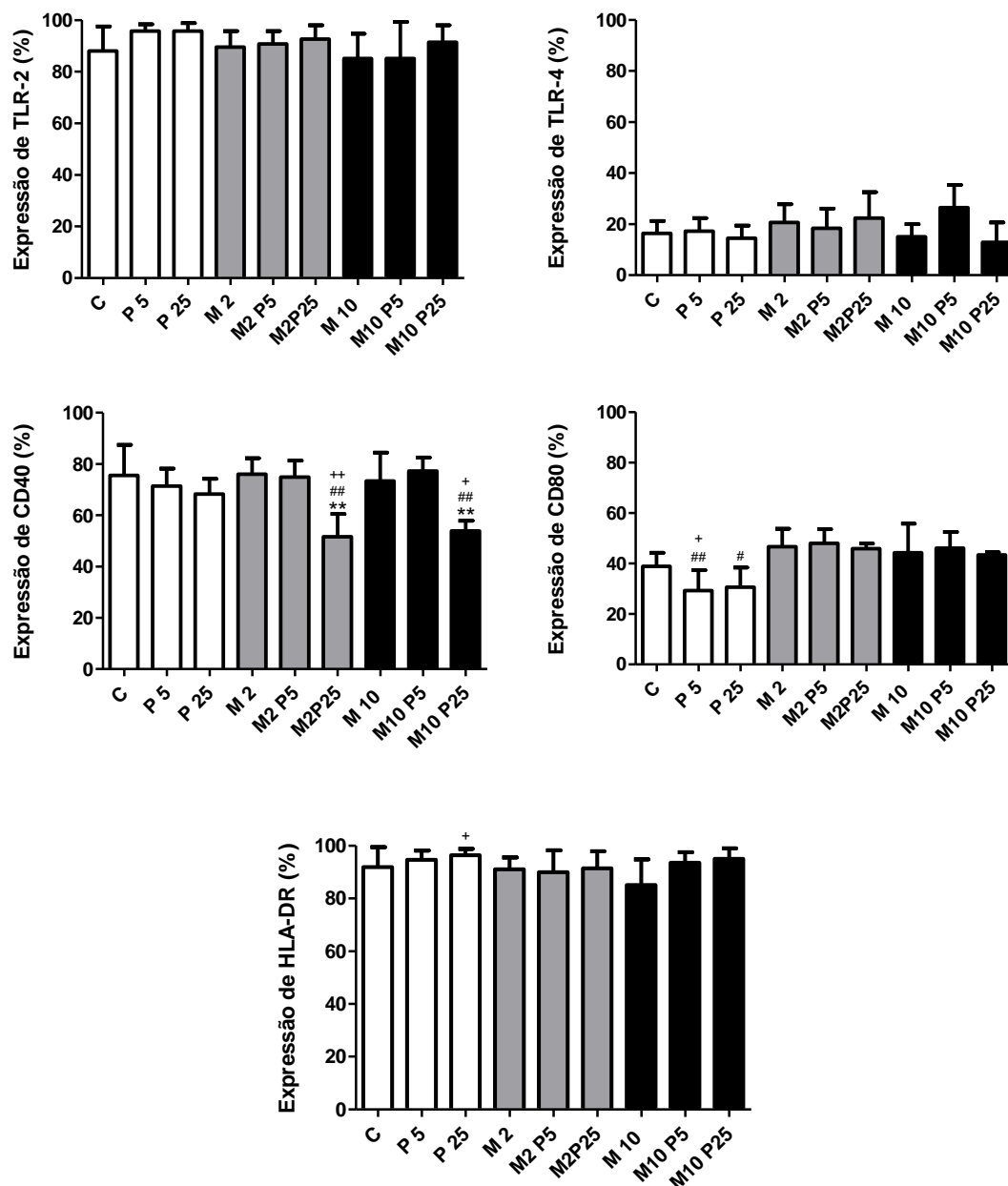


Figura 8. Frequência (%) de monócitos humanos (1×10^6 células/mL) que expressam TLR-2, TLR-4, CD40, CD80 e HLA-DR incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), MAGE-1 (M - 2 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e associação entre o MAGE-1 e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle (C): **($P < 0,001$). Significativamente diferente do MAGE 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (M2): #($P < 0,05$); ##($P < 0,001$). Significativamente diferente do MAGE 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (M10): + ($P < 0,05$); ++ ($P < 0,001$).

O MAGE-1, bem como a própolis e as associações não alteraram a expressão dos receptores TLR-2 e 4. A maior concentração de própolis em associação com MAGE-1 diminuiu os níveis de expressão de CD40 (M2P25 e M10P25). Em relação ao CD80, a própolis induziu menor expressão desse receptor, quando comparada ao MAGE-1 isoladamente, mas as associações não mostraram diferença na expressão de CD80, comparado ao controle e ao antígeno. A própolis não é descrita por apresentar efeito redutor na expressão de CD40, sendo que esse efeito inibitório da própolis em conjunto com MAGE-1, e outros antígenos, precisaria ser melhor investigado, uma vez que essa molécula é fundamental para ativação da resposta imune adquirida. Apesar da indiscutível importância da ligação CD40-CD40L no desenvolvimento de respostas imunes apropriadas, essa interação também está associada a diversos processos patológicos, como aumento de estresse oxidativo e contribuição nas doenças autoimunes e inflamatórias. Terapias com anticorpos que bloqueiam essa ligação estão sendo investigadas para o tratamento da doença inflamatória intestinal, caracterizada por resposta do tipo Th1 (Senhaji *et al.*, 2015). Assim, em determinadas condições, o bloqueio da expressão de CD40 pode ser uma via para desativação celular em processos inflamatórios intensos.

Não foram observadas alterações na expressão de HLA-DR em nenhum dos tratamentos, quando comparado ao controle (figuras 6 a 9). A molécula de HLA-DR é expressa constitutivamente em monócitos humanos de indivíduos saudáveis, sendo que sua expressão é essencial para a apresentação de antígenos aos linfócitos TCD4⁺, que levam ao desenvolvimento de uma resposta imune específica contra o agente agressor. Baixos níveis na expressão do HLA-DR estão associados a alta mortalidade, sendo utilizado como marcador de prognóstico para indivíduos com septicemia (Perry *et al.*, 2003).

De acordo com os resultados obtidos, a própolis isoladamente manteve a expressão basal dos receptores de superfície de monócitos humanos, os quais são importantes para reconhecimento (TLR-2 e TLR-4) e apresentação (HLA-DR, CD40 e CD80) de antígenos aos linfócitos T, concluindo que, na ausência de estimulação antigênica, a própolis não afetou a expressão de receptores celulares. A própolis em associação com MAGE-1 e LPS, antígenos que induzem respostas inflamatórias (Th1 e Th17, respectivamente), diminuiu a expressão de CD40 estimulada pelos antígenos isoladamente, sendo um possível mecanismo de ação da própolis para desativação celular em processos inflamatórios. Em relação a associação da própolis com AR, antígeno indutor de resposta anti-inflamatória (Treg), alterações na

expressão das moléculas coestimulatórias CD40 e CD80 foram observadas somente em comparação com o controle; no entanto, a associação não alterou o que foi estimulado pelo antígeno sozinho, demonstrando que a própolis parece manter a ação do AR. Já a associação da própolis com a EtxB, reduziu a expressão de TLR-4, CD40 e CD80, comparado ao controle ou à toxina sozinha, indicando a modulação da própolis frente a apresentação deste antígeno. Nossos resultados sugerem que esta modulação é dependente das concentrações de própolis e de antígenos utilizadas. Dessa forma, a própolis parece diminuir a resposta frente a antígenos inflamatórios e manter a ação do AR, favorecendo a resposta T reguladora, sendo que futuros ensaios são necessários para desvendar o(s) mecanismo(s) de ação envolvido(s) nesses processos.

3. Produção de citocinas

Citocinas são proteínas secretadas por diferentes tipos celulares e possuem diversas atividades, atuando em resposta à infecções, em processos inflamatórios, regenerativos, na regulação do metabolismo e na resposta imune, onde podem atuar também regulando a proliferação e diferenciação celular (Scheller *et al.*, 2011). Assim, esse estudo visou investigar a produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12 por monócitos humanos após o tratamento com diferentes antígenos, associados ou não a própolis.

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por APCs, tais como monócitos, macrófagos e DCs, e é capaz de ativar células *natural killer* (NK), linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, mediar respostas imunes contra patógenos intracelulares e também pode atuar na resistência ao desenvolvimento e progressão do câncer (Ma *et al.*, 2015). A IL-12 é descrita por induzir expressão de T-bet e auxiliar a diferenciação de células T *naive* em células Th1 (Raphael *et al.*, 2015), e a ausência de produção de IL-12 pode favorecer a indução de perfil Th2 (Lutz, 2016). A IL-12 não foi detectada nesse estudo, nas condições dos nossos ensaios. Bueno-Silva *et al.* (2015), ao estudarem células RAW 264.7, observaram que, quando estas células foram estimuladas somente com própolis, os níveis de IL-12 estavam abaixo do limite de detecção, similarmente ao que ocorreu com o controle (células sem tratamento). No estudo de Turcanu *et al.* (2002), monócitos humanos foram tratados concomitantemente com dois estímulos (LPS e INF- γ) no intuito de conseguir detectar maiores níveis de IL-12 (até 200 pg/mL),

reforçando a ideia de que essa é uma citocina de difícil detecção, similarmente ao que ocorreu em nosso trabalho.

A produção de citocinas por monócitos estimulados com AR está representada na figura 9. O tratamento de monócitos humanos com AR sozinho e em combinação com a própolis não apresentou diferença significativa na produção de IL-10. A própolis isoladamente (P25) induziu maior produção de TNF- α e sua associação com a menor concentração de AR (A1P25) inibiu essa produção, sendo semelhante a ação do antígeno sozinho (A1). Em relação a IL-6, o AR (A1) induziu maior produção dessa citocina, já sua combinação com própolis (A1P5 e A1P25) inibiu a produção de IL-6 que foi estimulada pelo ácido retinóico, sendo os níveis semelhantes ao induzido pela própolis isoladamente (P5 e P25).

ÁCIDO RETINÓICO

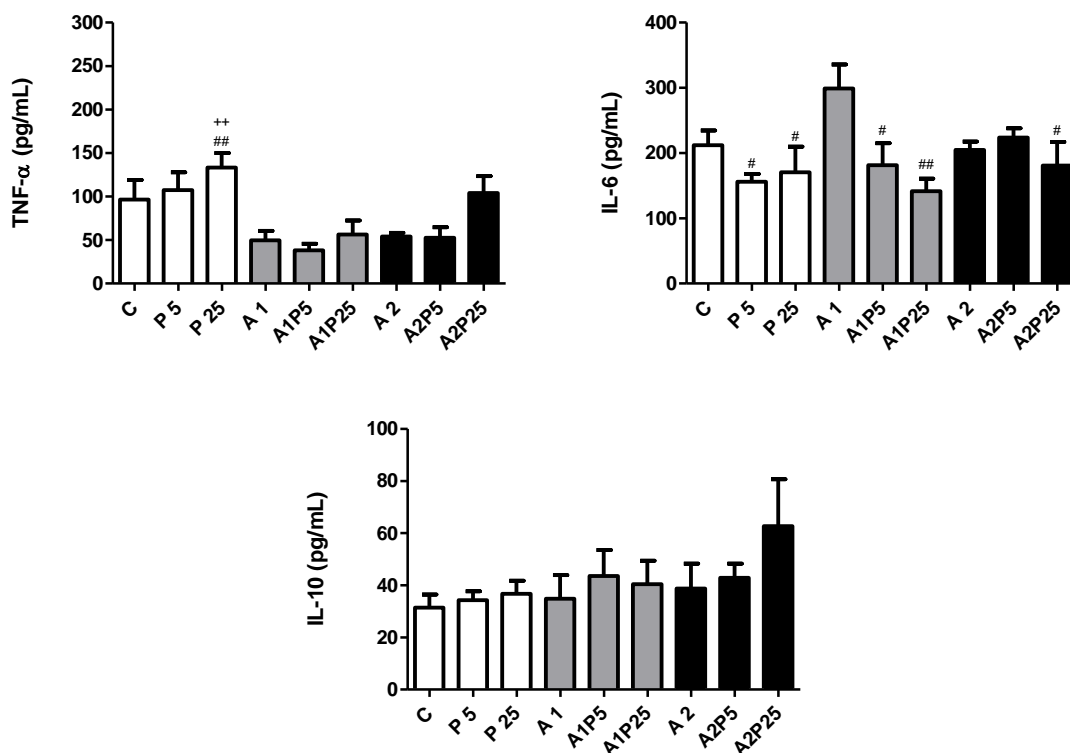


Figura 9. Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos (1×10^6 células/mL) incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), ácido retinóico (A - 10^{-8} e 10^{-7} M) e associação entre o ácido retinóico e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do ácido retinóico 10^{-8} M (A1): # ($P < 0,05$); ## ($P < 0,001$). Significativamente diferente do ácido retinóico 10^{-7} M (A2): ++ ($P < 0,001$).

Dawson *et al.* (2006), utilizando PBMC de doadores saudáveis, descreveram o efeito inibitório do AR na produção de citocinas do perfil Th1, como o TNF- α . Mohty *et al.* (2003) observaram que o AR, juntamente com GM-CSF, auxiliou na diferenciação de monócitos humanos em DCs e que essas células produziram níveis menores de TNF- α , em comparação às DCs que não foram estimuladas com AR. E em nosso trabalho, a associação com a própolis parece sustentar esse efeito inibitório do AR na produção de TNF- α .

Em relação ao direcionamento da resposta imune, Tsai *et al.* (2008) observaram que o tratamento de células THP-1 com AR levou à supressão das quimiocinas IP-10 e MDC, relacionadas às respostas Th1 e Th2, respectivamente. O AR vem se destacando por ser uma molécula com importante papel na indução de células Treg (Elias *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), além de estimular o ciclo celular, potencializando a proliferação de linfócitos T (Ertesvag *et al.*, 2002). Gu *et al.* (2015) comprovaram a capacidade do AR em aumentar a expressão de Foxp3 e expansão de iTregs em células de pacientes que foram submetidos ao transplante hepático, um achado importante que pode ser utilizado com o objetivo de evitar a rejeição em transplantados. Também Yang *et al.* (2015), em um estudo conduzido em animais, confirmaram a ação do AR em aumentar células T CD4⁺Foxp3⁺, sugerindo seu potencial para o controle da progressão da doença do enxerto *versus* hospedeiro e no tratamento de outras doenças inflamatórias. O AR exerce suas atividades através da ligação ao receptor de AR (RAR), o qual forma heterodímeros com o receptor de retinóide X (RXR), conhecidos pela sigla RAR–RXR (Mora *et al.*, 2008). Uma amostra de própolis brasileira foi descrita por apresentar um composto com atividade agonista de RXR (Nakashima *et al.*, 2014), o que pode abrir novos caminhos na busca de terapias com AR em associação à própolis.

Nossos dados demonstram que o AR induziu a produção de IL-6, citocina envolvida no desenvolvimento de células Th17, que geram respostas implicadas em várias condições inflamatórias e são funcionalmente opostas a células Treg, além de estarem envolvidas na supressão da diferenciação em Th1 e Th2 (Chen *et al.*, 2011; Raphael *et al.*, 2015). No entanto, Lu *et al.* (2014) demonstraram que o pré-tratamento com AR é capaz de sustentar a expressão de Foxp3⁺ e evitar a conversão das células em Th1 e Th17 mesmo sob o estímulo de IL-6. E também Mucida *et al.* (2007) verificaram que mesmo na presença de IL-6, e outros estímulos, o AR foi capaz de suprimir a indução de células Th17. Dessa forma, apesar da IL-6 ser indutora de células Th17, quando ela está presente em um microambiente estimulado com

AR, esse metabólito parece impedir a ação da citocina na diferenciação de Th17, sendo que um provável mecanismo para isso é a inibição da expressão do receptor de IL-6, induzida pelo AR (Xiao *et al.*, 2008).

Além do seu papel na transição da resposta imune inata para adquirida, a IL-6 também atua em processos inflamatórios, sendo produzida no início da inflamação e auxiliando na atração de neutrófilos, monócitos e aumentando moléculas de adesão celular (Scheller *et al.*, 2011). Uma vez que a associação com a própolis reduziu a produção de IL-6, o uso desse produto natural pode ser uma estratégia interessante para controlar determinadas condições inflamatórias.

A figura 10 apresenta a produção de citocinas pela EtxB. Embora não significativamente, observa-se um aumento na produção de TNF- α induzida pela EtxB. Em determinadas concentrações, a própolis suprimiu a produção de TNF- α que foi induzida pela toxina (E2P25 e E10P5). A menor concentração da EtxB (E2) induziu maior produção de IL-6, comparada à maior concentração utilizada (E10), a qual em associação ou não com a própolis diminuiu a produção dessa citocina. Em relação a IL-10 não houve diferença entre os tratamentos.

EtxB

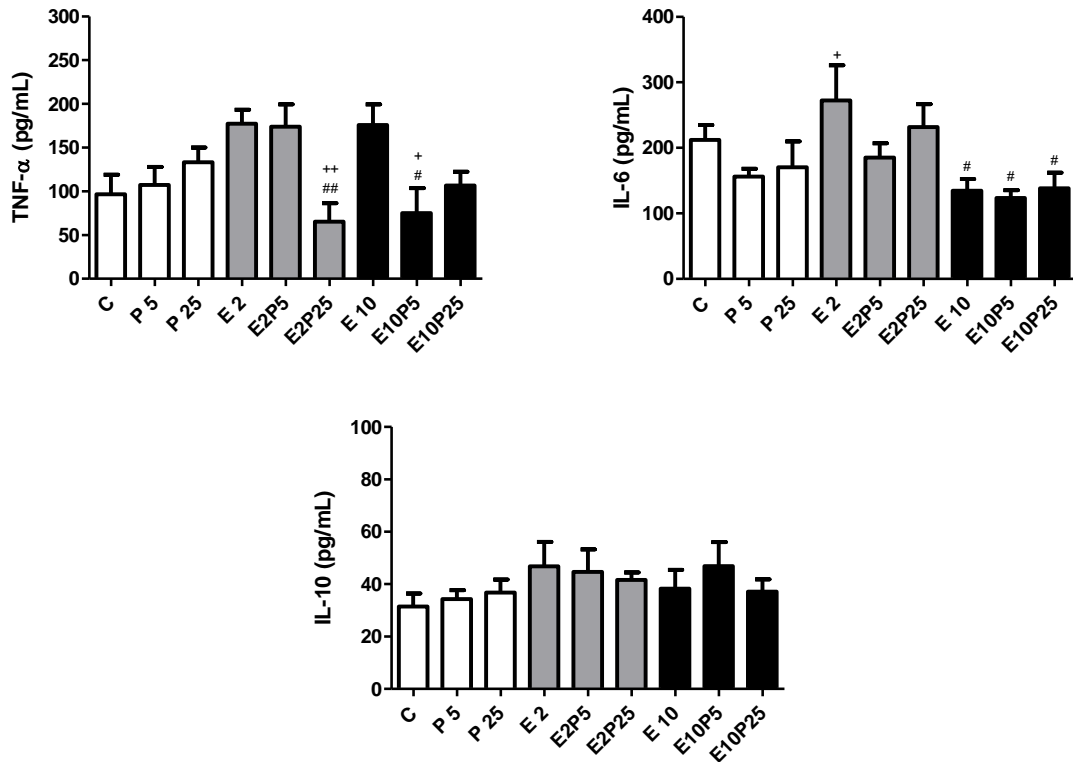


Figura 10. Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos (1×10^6 células/mL) incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), EtxB (E - 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e associação entre a EtxB e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente de EtxB 2 $\mu\text{g/mL}$ (E2): # ($P < 0,05$); ## ($P < 0,001$). Significativamente diferente de EtxB 10 $\mu\text{g/mL}$ (E10): + ($P < 0,05$); ++ ($P < 0,001$).

Domingos *et al.* (2009) observaram que a subunidade B da enterotoxina de *E. coli* induziu a produção de TNF- α em células J774A.1, uma linhagem de macrófagos murinos, e também em monócitos humanos, semelhante ao que foi encontrado nesse trabalho. A EtxB também induziu a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 por células THP-1 (Hajishengallis *et al.*, 2004). Turcanu *et al.* (2002) demonstraram que a EtxB estimulou a produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 por monócitos humanos de uma maneira tempo e dose-dependente, ao passo que não foi capaz de induzir a produção de IL-8, IL-12 e TGF- β . A toxina além de não estimular a produção de IL-12, foi também capaz de diminuir a produção dessa citocina em culturas de monócitos estimulados com LPS e INF- γ , chegando a impedir completamente a secreção de níveis detectáveis de IL-12p40. Somados a outros resultados, os autores puderam concluir que a EtxB parece favorecer a indução de células Th2 e T reguladoras. Esse antígeno já tem

demonstrado potente ação imunomoduladora em estudos com modelos animais, destacando-se por seu potencial para tratamento ou prevenção de doenças autoimunes.

Além disso, a EtxB vem sendo estudada como adjuvante de vacinas, sendo capaz de aumentar a produção de anticorpos quando coadministrada com antígenos, em comparação à administração do antígeno sozinho (Norton *et al.*, 2012). Dentre outras atividades que a IL-6 apresenta, ela está envolvida na diferenciação de linfócitos T *naive* em T *helper* que ativados são capazes de promover a ativação de células B e, conseqüentemente, a secreção de anticorpo (Eddahri *et al.*, 2009), podendo ser um dos mecanismos pelos quais a EtxB estimula a resposta humoral. Já Donaldson *et al.* (2013) demonstraram que o tratamento com EtxB em camundongos sensibilizados com ovalbumina culminou em melhora no quadro da doença, com aumento de células TCD4⁺ Foxp3⁺, sendo importante na indução de respostas reguladoras. A EtxB também parece ser importante na prevenção ou tratamento da artrite reumatoide, uma vez que sua administração está associada a redução da reatividade celular Th1 e aumento da atividade de células Treg em camundongos com artrite induzida pré-tratados com a toxina (Luross *et al.*, 2002).

Assim, de acordo com estudos prévios, a EtxB parece direcionar para respostas anti-inflamatórias (Th2 e Treg). Nesse trabalho observamos que a combinação da própolis à toxina, em determinadas concentrações, é capaz de suprimir a produção de TNF- α , citocina de caráter multifuncional, que é capaz de induzir a produção de outras citocinas e quimiocinas pelas células do sistema imune, induzindo, também, a expressão de moléculas de adesão e o aumento da permeabilidade do endotélio, favorecendo maior concentração de células no local inflamado. Dessa forma, o TNF- α é considerado um agente pró-inflamatório e ativador do fator de transcrição NF- κ B, o que resulta na ativação de genes envolvidos na inflamação, sobrevivência, diferenciação e crescimento celular (Dobrovolskaia & Kozlov, 2005; Hehlhans & Pfeffer, 2005). Uma vez que essa citocina participa no desenvolvimento de respostas inflamatórias locais e sistêmicas, sua diminuição causada pela associação com a própolis demonstra que o produto apícola pode favorecer um *status* anti-inflamatório.

A figura 11 representa a produção de citocinas pelo LPS. Esse antígeno estimulou a produção de todas as citocinas, embora de maneira não significativa para TNF- α .

LIPOPOLISSACARÍDEO

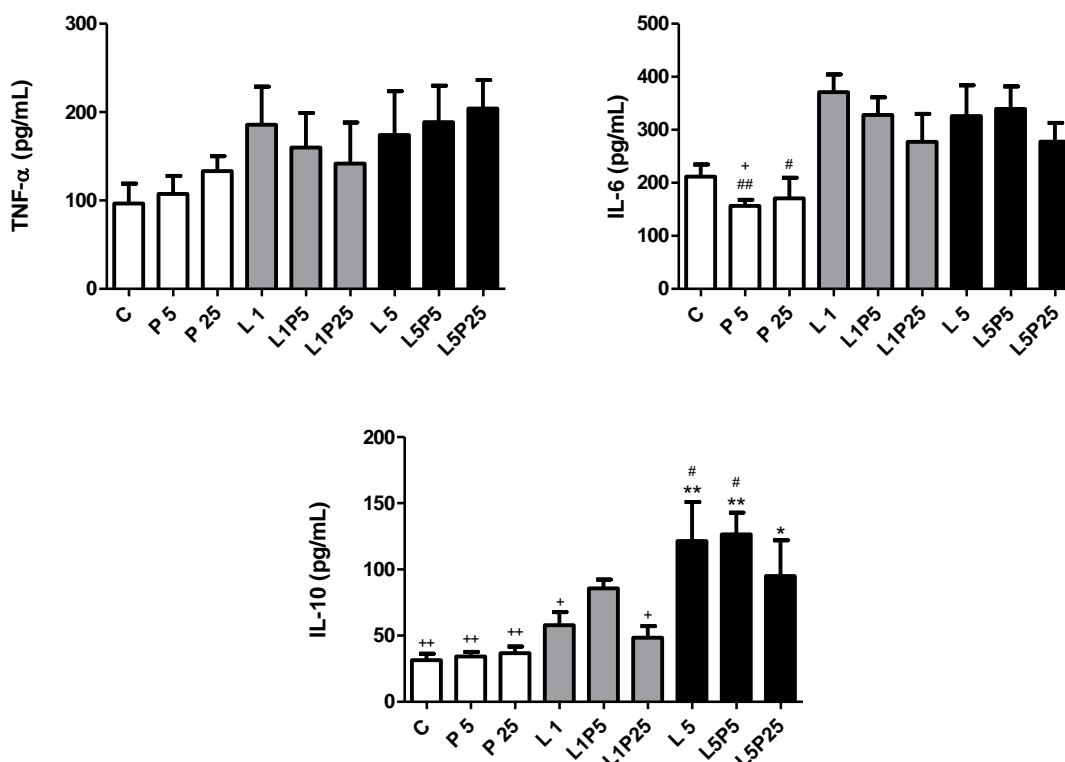


Figura 11. Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos (1×10^6 células/mL) incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P – 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), LPS (L – 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$) e associação entre o LPS e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle (C): *($P < 0,05$); **($P < 0,001$). Significativamente diferente do LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (L1): #($P < 0,05$); ## ($P < 0,001$). Significativamente diferente do LPS 5 $\mu\text{g/mL}$ (L5): + ($P < 0,05$); ++ ($P < 0,001$).

Cardoso *et al.* (2017) também verificaram o efeito imunoestimulador do LPS em monócitos humanos, sendo que o antígeno foi capaz de estimular a liberação das três citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10), caráter ativador que também foi demonstrado em DCs humanas (Conti *et al.*, 2016). No trabalho de Bueno-Silva *et al.* (2015), células RAW 264.7 estimuladas simultaneamente com LPS e própolis, resultaram em aumento na produção de TNF- α e IL-6, comparado ao controle basal e a própolis isoladamente, enquanto a associação levou a diminuição da IL-10 em comparação ao que foi produzido pelas células estimuladas somente com LPS. Já Wang *et al.* (2013) encontraram que a própolis inibe a produção de IL-6 por células RAW 264.7 estimuladas com LPS, de maneira dose-dependente. Os dados divergentes da literatura podem ser explicados pelo uso de diferentes amostras de própolis, uma vez que

amostras de regiões distintas apresentam origem vegetal e, conseqüentemente, composição química diferente, o que está relacionado com suas atividades biológicas (Sforcin, 2016).

O aumento da produção de IL-6 pelo LPS visto nesse estudo é corroborado por trabalhos de outros autores que verificaram que várias bactérias, e seus produtos, estimulam células imunes a secretar essa citocina (Khader *et al.*, 2009), confirmando o potencial desse antígeno para indução de células Th17. Essa resposta é especialmente proeminente na mucosa intestinal, onde favorece a manutenção da homeostase e confere proteção contra microorganismos, sendo que o tratamento com antibióticos está relacionado à redução desse subtipo celular no intestino de camundongos (Gálvez *et al.*, 2014). Assim, a manutenção dos níveis dessa citocina pela própolis quando associada ao LPS, indica que o uso desse produto natural possa ser interessante quando utilizado com o objetivo de manter a homeostase na mucosa intestinal, evitando a ocorrência de processos infecciosos e desregulação da microbiota.

Em modelos animais, a própolis tem mostrado ação benéfica na preservação da integridade da mucosa intestinal (Khayyal *et al.*, 2015) e na redução da translocação microbiana (Sabuncuoglu *et al.*, 2007). Contudo, a presença de estruturas bacterianas, como LPS, na corrente sanguínea é extremamente prejudicial ao hospedeiro, podendo levar ao desenvolvimento de choque séptico, e até mesmo à morte do indivíduo. Sendo, nesse caso, necessário o desenvolvimento de uma resposta imune anti-inflamatória (Li & Alam, 2012). Nesse sentido, a própolis, como uma substância de caráter antimicrobiano e imunomodulador, pode fornecer uma melhora no quadro clínico, associado a outras medidas de intervenção. Korish & Arafa (2011) observaram que um derivado da própolis, o cafeato de feniletila (CAPE), quando administrado a ratos tratados com LPS, levou a diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias. Junto com outros achados, os autores concluíram que o CAPE pode aliviar a resposta inflamatória sistêmica, bem como danos hepáticos e neuronais, sendo considerado um agente promissor no auxílio da profilaxia e tratamento do choque séptico. Outros autores também demonstraram o efeito anti-inflamatório da própolis, e seus compostos, em resposta ao LPS (Blonska *et al.*, 2004; Búfalo *et al.*, 2013; Ertürküner *et al.*, 2016; Funakoshi-Tago *et al.*, 2016).

A produção de citocinas pelo MAGE-1 está apresentada na figura 12. Esse antígeno induziu a produção de moléculas pró-inflamatórias, TNF- α (M2 e M10) e IL-6 (M2), e, sozinho, não estimulou a liberação de IL-10 (M2 e M10). Porém, quando combinado com a própolis, o produto apícola inibiu a produção de TNF- α (M2P5) e IL-6 (M2P5 e M2P25) que

foram induzidas pelo MAGE-1, ao mesmo tempo que aumentou a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 quando associada a maior concentração do antígeno (M10P5 e M10P25).

MAGE-1

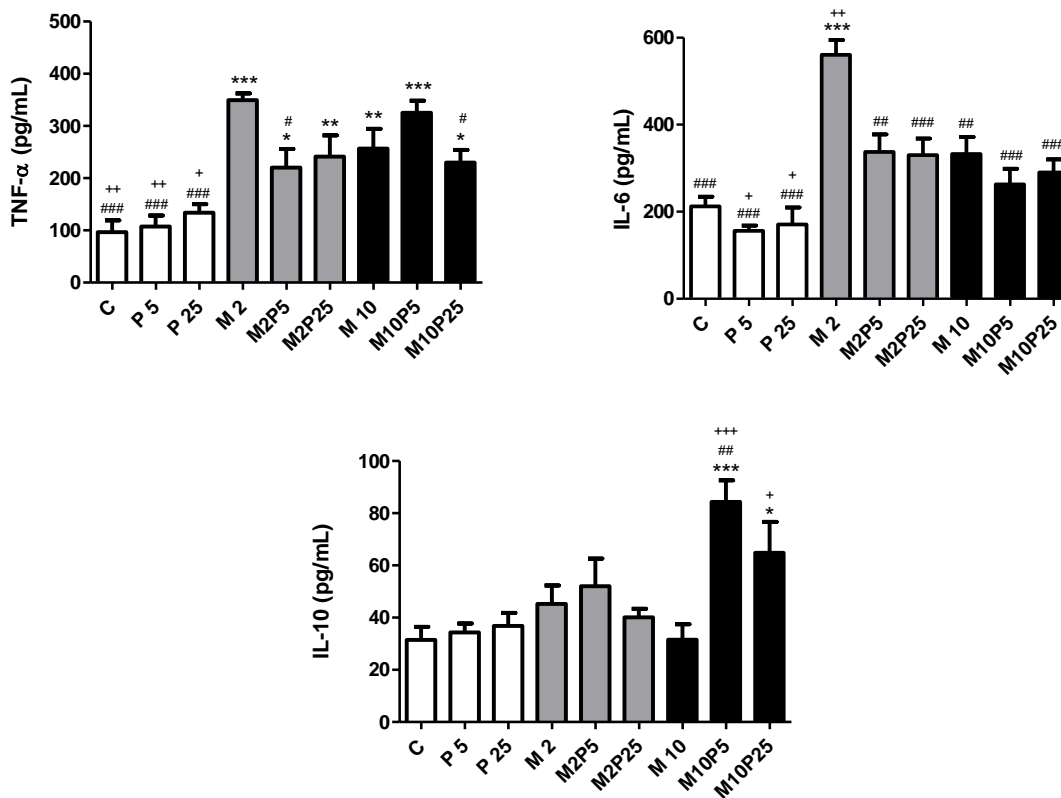


Figura 12. Produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos (1×10^6 células/mL) incubados por 24 h com meio de cultura (controle - C), própolis (P - 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), MAGE-1 (M - 2 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e associação entre o MAGE-1 e a própolis, conforme apresentado na figura 2. Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle (C): *($P < 0,05$); **($P < 0,001$); ***($P < 0,0001$). Significativamente diferente do MAGE 2 $\mu\text{g/mL}$ (M2): #($P < 0,05$); ##($P < 0,001$); ###($P < 0,0001$). Significativamente diferente do MAGE 10 $\mu\text{g/mL}$ (M10): + ($P < 0,05$); ++ ($P < 0,001$); +++ ($P < 0,0001$).

De Lastic *et al.* (2016) realizaram um estudo com DCs estimuladas com peptídeos do antígeno tumoral MAGE-3 que foram posteriormente transferidas para co-culturas com linfócitos do mesmo doador. A estimulação antigênica levou a produção de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1. Porém, quando a cultura foi realizada com DCs irradiadas houve mudança para um fenótipo supressor, com falha na indução de IFN- γ e TNF- α , concluindo que a integridade das células apresentadoras de antígeno é essencial para o desenvolvimento

da resposta imune. Ueda *et al.* (2007) observaram aumento significativo na produção de IFN- γ por PBMC de pacientes que foram submetidos a imunoterapia de DCs estimuladas com MAGE-1, comparado aos níveis produzidos antes da terapia. Uma vez que o tratamento com IFN- γ pode gerar aumento na expressão de MHC de classe I em células de glioblastoma (que expressam MAGE-1) e, conseqüentemente, aumento no reconhecimento das células tumorais pelos linfócitos T citotóxicos (Liu *et al.*, 2004), a resposta Th1 parece ser importante no início do desenvolvimento da resposta anti-tumoral frente a esse antígeno. Chakraborty *et al.* (2004), após imunização de pacientes com uma vacina de APCs estimuladas com peptídeo sintético de MAGE-1, observaram aumento inicial de células T citotóxicas específicas ao antígeno, mas que não persistiram por muito tempo. Esse resultado foi relacionado ao aumento na produção de IL-10 por linfócitos TCD4⁺ 28 dias após a vacinação, cuja produção pode ser associada a presença de células Treg (Raphael *et al.*, 2015). Em nosso estudo, a própolis mostrou-se capaz de modular a resposta imune frente ao MAGE-1, uma vez que reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumentou a produção de IL-10, citocina que apresenta efeito imunossupressor, a qual pode atuar diminuindo a expressão de MHC II e moléculas coestimulatórias, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, e também auxiliando a geração e manutenção de células Treg (Raphael *et al.*, 2015). Assim, nessas condições, a própolis parece desviar a resposta para um perfil desativador, o que pode ser importante para evitar o dano ao hospedeiro.

Tomados juntos, os resultados desse estudo sugerem que a própolis, frente a estimulação com diferentes antígenos, exerce um perfil anti-inflamatório, ação que já tem sido documentada na literatura por outros autores (Hu *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2007; Búfalo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Cavendish *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016). Khayyal *et al.* (2003) verificaram que pacientes com asma que fizeram uso de própolis tiveram redução significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-8 e IL-6) após o tratamento, bem como aumento nos níveis de IL-10. No entanto, dados que relacionam a ação da própolis na ativação de células T são escassos. Rifa'i & Widodo (2014) descreveram que a administração de própolis em camundongos estimulou o aumento de células T CD4⁺CD25⁺, marcador de células Treg, comparado ao grupo controle, sugerindo que este produto apícola é capaz de promover a ativação e proliferação celular, além de ser descrita por apresentar efeito supressor na diferenciação de células Th17 (Okamoto *et al.*, 2012) e Th1 (Okamoto *et al.*, 2013). Dessa forma, esses dados sugerem que a própolis pode ser importante no auxílio do

tratamento de doenças com caráter inflamatório ou autoimune, o que abre perspectivas para novas investigações.

4. Expressão de genes relacionados à autofagia

A autofagia está envolvida em vários processos importantes para a manutenção da homeostase celular, bem como na resposta imunológica, fornecendo peptídeos para a apresentação antigênica e auxiliando na eliminação de micro-organismos (Ravikumar *et al.*, 2010). Assim, visamos investigar se a própolis poderia modular o processo de autofagia, avaliando a expressão de genes que codificam Beclin-1 e LC3-II, proteínas essenciais no desenvolvimento da autofagia.

Para essa finalidade utilizamos a concentração de própolis de 25 µg/mL, por ter induzido maior produção de TNF- α , uma citocina que está envolvida na indução da autofagia (Deretic & Levine, 2009). Esse tratamento foi realizado com intuito de investigar se a própolis poderia, em condições normais (sem estímulo), induzir a autofagia. As células foram incubadas também com um indutor de autofagia, a rapamicina (800 nM), simultaneamente ou não à própolis, para verificar se o apiterápico pode modular a indução da autofagia. Os resultados desses ensaios estão representados na figura 13.

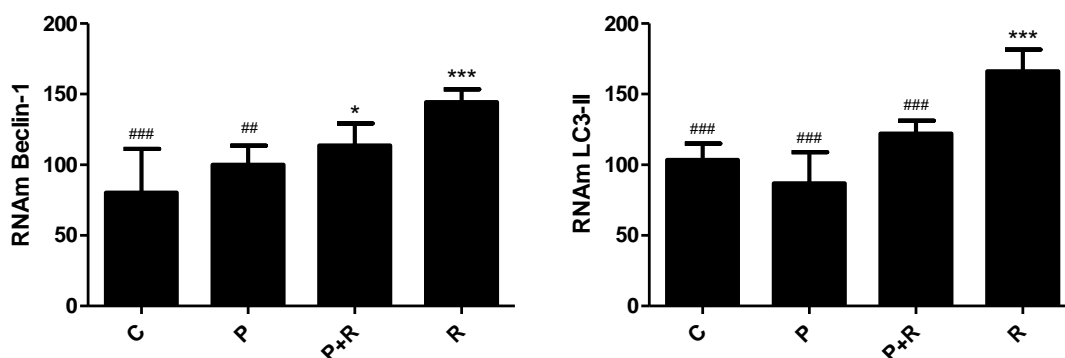


Figura 13. Expressão gênica de Beclin-1 e LC3-II em monócitos humanos (1×10^6 células/mL) incubados por 4 h com meio de cultura (controle – C), própolis (P – 25 µg/mL), rapamicina (R – 800 nM) e a associação própolis + rapamicina (P - 25 µg/mL + R - 800 nM). Os dados representam média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle (C): *($P < 0,05$) e ***($P < 0,0001$). Significativamente diferente da rapamicina (R): ##($P < 0,001$) e ###($P < 0,0001$).

A própolis, isoladamente, não alterou a expressão dos genes avaliados, sendo esta expressão similar à das células controle. Dessa forma, o tratamento com própolis, por si só,

não é capaz de induzir autofagia. Esse é um resultado relevante, uma vez que a autofagia deve ocorrer somente sob determinadas condições, como, por exemplo, privação de nutrientes e processos infecciosos. Na ausência desses estímulos, a autofagia é um processo dispensável, estando inibida em condições normais (Ravikumar *et al.*, 2010).

Já o tratamento das células com rapamicina induziu a expressão de ambos os genes avaliados, sendo significativamente diferente do controle. Esse resultado já era esperado, uma vez que a rapamicina é um agente farmacológico indutor de autofagia, confirmando a correta padronização de nossos ensaios. Seu mecanismo de ação envolve a inibição de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que representa um sinal inibitório da autofagia (Ravikumar *et al.*, 2010).

Entretanto, quando a própolis foi associada à rapamicina, o produto natural conteve a ação da droga. A associação permaneceu significativamente diferente do controle para expressão do gene relativo à Beclin-1, e não diferiu significativamente da rapamicina isoladamente, embora tenha induzido menor expressão do gene em comparação à rapamicina. Com relação a LC3-II, a associação não diferiu da expressão nas células sem tratamento, diferentemente do que ocorreu com as células tratadas com rapamicina, sugerindo que a própolis é capaz de inibir a autofagia.

Harris *et al.* (2007) demonstraram que as citocinas IL-4 e IL-13, relacionadas ao perfil Th2, são capazes de inibir a autofagia, ao contrário das citocinas liberadas por células Th1, que são indutoras de autofagia (Deretic & Levine, 2009). Isso sugere um possível mecanismo de ação da própolis no bloqueio da autofagia: o apiterápico pode induzir respostas Th2, que secretam citocinas inibidoras da via autofágica. Pagliarone *et al.* (2009) já observaram que, em camundongos estressados, a própolis aumenta a produção de IL-4, descrevendo que esse apiterápico favorece a resposta imune humoral. Além disso, outros autores observaram que a estimulação do receptor CD40 também pode induzir autofagia (Andrade *et al.*, 2006). Uma vez que a própolis, associada aos antígenos, reduziu a expressão de CD40, esses resultados fornecem evidências concordantes para o papel inibitório da própolis no processo de autofagia, já que a própolis pode inibir a autofagia via inibição de CD40 e indução de resposta Th2.

Alguns autores sugerem também que a inibição da autofagia pode estar relacionada com a indução do inflamassoma. Essa via consiste em um complexo citosólico multiproteico responsável pela detecção de PAMPs localizados no citoplasma celular, e, assim como a

autofagia, é um elemento essencial da resposta imune (Abdelaziz *et al.*, 2015). Como exemplo, Saito *et al.* (2008) descreveram que a deficiência de Atg16L1, proteína associada a formação de autofagossomos, leva a produção de grandes quantidades de IL-1 β e IL-18, citocinas relacionadas a ativação do inflamassoma. Isso indica que a via da autofagia regula negativamente a via do inflamassoma. Com isso, uma vez que a amostra de própolis utilizada nesse estudo inibiu a indução da autofagia, sua ação na ativação do inflamassoma merece ser investigada, abrindo perspectivas para novas investigações. A indução dessa via é de grande importância na defesa contra patógenos, além de ser também ativada em condições de estresse, dano tecidual, em resposta a adjuvantes vacinais, entre outros estímulos. Além disso, as citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33, produtos da ativação do inflamassoma, podem auxiliar na apresentação de antígenos, ou contribuir diretamente para ativação de células T e B. (Martinon *et al.*, 2009). A IL-33 é capaz de induzir a expressão de citocinas características do perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 (Schmitz *et al.*, 2005). Da mesma forma, as citocinas IL-1 e IL-18 também podem promover a polarização para esse perfil (Helmbj & Grecis, 2004; Nakanishi *et al.*, 2001). Assim, apesar de ser considerada uma via inflamatória, o inflamassoma pode favorecer o desenvolvimento de respostas Th2 (Martinon *et al.*, 2009), corroborando a ação anti-inflamatória da própolis observada nesse estudo.

Assim, nossos resultados indicam que a própolis não contribuiu para a apresentação de antígenos por meio da autofagia. Entretanto, a inibição dessa via pode ser uma estratégia interessante para terapia contra o câncer (Towers & Thorburn, 2016), tendo em vista que sua indução fornece suporte para sobrevivência da célula tumoral em condições de hipóxia e privação de nutrientes (Ravikumar *et al.*, 2010), indicando novos caminhos para o estudo da própolis e autofagia.

Conclusões

- ✓ A própolis não alterou a viabilidade de monócitos humanos, ao mesmo tempo em que exerceu um efeito citoprotetor nas células incubadas com os antígenos (Ácido retinóico, Subunidade B da enterotoxina termolábel de *E. coli*, Lipopolissacarídeo e MAGE-1).
- ✓ A própolis manteve a expressão basal de receptores de superfície celular importantes no reconhecimento (TLR-2 e 4) e apresentação (HLA-DR, CD40 e CD80) de antígenos. Porém, em associação com MAGE-1 e LPS, indutores de respostas inflamatórias (Th1 e Th17, respectivamente), diminuiu a expressão de CD40 que foi estimulada pelos antígenos isoladamente, sendo um possível mecanismo de ação da própolis para desativação celular em processos inflamatórios. Com o AR, indutor de resposta anti-inflamatória (Treg), a própolis manteve a ação do AR sobre os receptores. Dessa forma, a própolis diminuiu a resposta frente a antígenos inflamatórios e manteve a ação do AR, favorecendo a resposta T reguladora.
- ✓ A própolis apresentou caráter anti-inflamatório, inibindo a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (quando incubada com EtxB e MAGE-1) e IL-6 (quando incubada com AR e MAGE-1), e aumentando a produção de IL-10 (quando incubada com MAGE-1), citocina de ação anti-inflamatória. Dessa forma, esses resultados abrem perspectivas para o uso da própolis no auxílio do tratamento de condições inflamatórias.
- ✓ A própolis, isoladamente, não estimulou a expressão dos genes que codificam Beclin-1 e LC3-II, proteínas essenciais para a autofagia. A associação da própolis à rapamicina, droga indutora de autofagia, conteve a expressão dos genes que foi induzida pelo fármaco, sugerindo que a própolis é capaz de inibir a autofagia, o que pode ocorrer via indução de resposta Th2.

Assim, com os resultados obtidos com monócitos humanos, foi possível verificar que a própolis exerceu ação imunomoduladora na presença de antígenos, favorecendo respostas anti-inflamatórias. Ademais, o efeito modulador da própolis na apresentação antigênica é independente da autofagia.

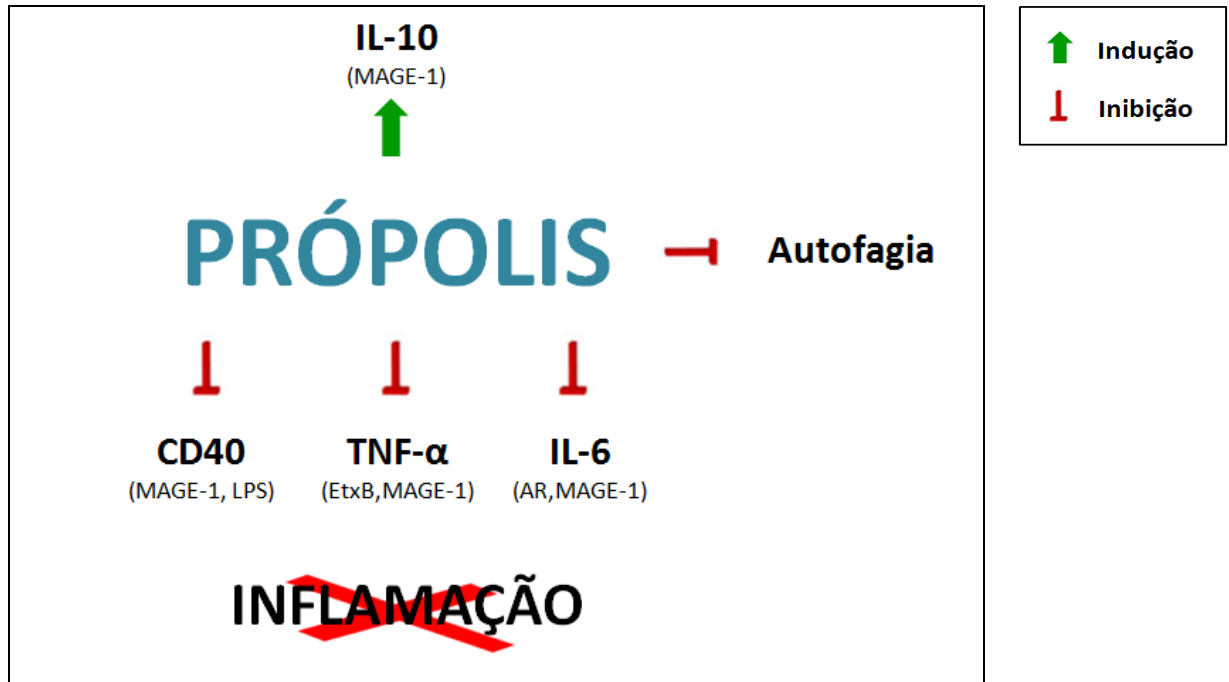


Figura 14. Esquema da ação imunomoduladora/anti-inflamatória da própolis em monócitos na presença de antígenos e na autofagia.

Considerações finais

Experimentos para avaliar a ativação de fatores de transcrição ainda serão realizados, com o objetivo de esclarecer possíveis vias pelas quais a própolis pode agir.

Ademais, projetos paralelos estão sendo desenvolvidos para melhor esclarecer o papel da própolis na diferenciação de linfócitos, avaliando se ela pode, de fato, auxiliar no desenvolvimento de um perfil de resposta. Assim, os dados obtidos em conjunto permitirão a análise dos efeitos da própolis na modulação da apresentação antigênica e ativação diferencial de linfócitos T. Esses resultados poderão implicar no uso futuro da própolis em esquemas vacinais, em terapias antitumorais, no tratamento de infecções, doenças auto-imunes, entre outros, dependendo do perfil que seja favorecido pela própolis.

Referências bibliográficas

- ABDELAZIZ, D.H.A.; KHALIL, H.; CORMET-BOYAKA, E.; AMER, A.O. The cooperation between the autophagy machinery and the inflammasome to implement an appropriate innate immune response: do they regulate each other? **Immunological Reviews**, v.265, p.194-204, 2015.
- ANDRADE, R.M.; WESSENDARP, M.; GUBBELS, M.J.; STRIEPEN, B.; SUBAUSTE, C.S. CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, p.2366-77, 2006.
- ARNOLD, C.E.; GORDON, P.; BARKER, R.N.; WILSON, H.M. The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. **Immunobiology**, v.220, p. 10–19, 2015.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 669–92, 2009.
- BANKOVA, V., BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., POPOV, S., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-367, 1998.
- BANKOVA, V., BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., SFORCIN, J.M., FRETE, X., KUJUMGIEV, A., MAIMONI-RODELLA, R., POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 54, p. 401-5, 1999.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 29-32, 2005.
- BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.P.; SCHELLER, S.; KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.25–30, 2004.
- BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., BANKOVA V., SFORCIN JM., NIKOLOVA N., POPOV S. Phenolics from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p. 676-9, 1997.
- BÜELER, H., MULLIGAN, R.C. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1. **Molecular Medicine**, v. 2, p. 545-55, 1996.
- BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E.S.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L.; MAYER, M.P.A. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. **PLoS One**, v.10, n.12, 2015.
- BÚFALO, M.C., CANDEIAS, J.M., SFORCIN, J.M. *In vitro* cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 483-7, 2009.
- BÚFALO, M.C., FERREIRA, I., COSTA, G., FRANCISCO, V., LIBERAL, J., CRUZ, M.T., LOPES, M.C., BATISTA, M.T., SFORCIN, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 84-92, 2013.
- BÚFALO, M.C., BORDON-GRACIANI, A.P., CONTI, B.J., GOLIM, M.A., SFORCIN, J.M. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1497-504, 2014.

- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-63, 1998.
- CARDOSO, E.O.; CONTI, B. J; SANTIAGO, K.B.; CONTE, F.L.; OLIVEIRA, L.P.G; HERNANDES, R.T.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.69, p.99-108, 2017.
- CAUCHETEUX, S.M.; HU-LI, J.; MOHAMMED, R.N.; AGER, A.; PAUL, W.E. Cytokine regulation of lung Th17 response to airway immunization using LPS adjuvant. **Mucosal Immunology**, 2016.
- CAVENDISH, R.L., SANTOS, J.S.; NETO, R. B.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; DIVINO ARAUJO, E.D.; SILVA, A.A.B.; THOMAZZI, S.M.; CARDOSO J, C.; GOMES, M.Z. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.173, p.127-33, 2015.
- CHAKRABORTY, N.G.; CHATTOPADHYAY, S.; MEHROTRA, S.; CHHABRA, A.; MUKHERJI, B. Regulatory T-Cell Response and Tumor Vaccine-induced Cytotoxic T Lymphocytes in Human Melanoma. **Human Immunology**, v.65, p.794–802, 2004.
- CHAUX, P.; LETHÉ, B.; VAN SNICK, J.; CORTHALS, J.; SCHULTZ, E.S.; CAMBIASO,C.L.; BOON, T.; VAN DER BRUGGEN, P. A MAGE-1 peptide recognized on HLA-DR15 by CD4(+) T cells. **European Journal of Immunology**, v.31, n.6, p. 1910-6, 2001.
- CHEN, Z; LIN, F; GAO, Y; LI, Z; ZHANG, J; XING, Y; DENG, Z; YAO, Z; TSUN, A; LI, B. FOXP3 and ROR γ t: Transcriptional regulation of Treg and Th17. **International Immunopharmacology**, v.11, p.536–42, 2011.
- CHO, H.Y.; CHOI, E.K.; LEE, S.W.; KIM, K.H.; PARK, S.J.; LEE, C.K.; LEE, S.W. All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells. **Immunology Letters**, v.136, p.97-107, 2011.
- 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. 1-7, 2013.
- CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; BÚFALO, M. C.; HERRERA, Y. F.; ALDAY, E.; VELAZQUEZ, C.; HERNANDEZ, J.; SFORCIN, J. M. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1431-1438, 2015.
- CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; CARDOSO E.O.; FREIRE, P.P.; CARVALHO, R.F.; GOLIM, M.A.; SFORCIN, J.M. Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF- κ B activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2016.
- CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**. v.8, n.1, p.26-38, 2010.
- CUNHA, I.B.S., SAWAYA, A.C.H.F., CAETANO, F.M., SHIMIZU, M.T., MARCUCCI, M.C., DREZZA, F.T., POVIA, G.S., CARVALHO, P.O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 964-70, 2004.
- DA SILVA, S. S.; THOMÉ, G. S.; CATANEO, A. H. D.; MIRANDA, M. M.; FELIPE, I.; ANDRADE, C. G. T. J.; WATANABE, M. A. E.; PIANA, G. M.; SFORCIN, J. M.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

- DAWSON, H.D.; COLLINS, G.; PYLE, R.; KEY, M.; WEERARATNA, A.; DEEP-DIXIT, V.; NADAL, C.N.; TAUB, D.D. Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. **BMC Immunology**, v.7, 2006.
- DE CASTRO, S.L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Annual Review of Biomedical Science**, v. 3, p. 49-83, 2001.
- DE LASTIC, A. L.; RODI M.; MOUZAKI, A. Effect of dendritic cell state and antigen-presentation conditions on resulting T-cell phenotypes and Th cytokine profiles. **Immunobiology**, v.221, n.8, p.862-70, 2016.
- DELGADO, M.A.; DERETIC, V. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n.7, p.976-983, 2009.
- DERETIC, V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. **Immunological Reviews**, v.240, p.92-104, 2011.
- DERETIC, V.; LEVINE, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. **Cell Host & Microbe**, v.5, p.527-54, 2009.
- DOBROVOLSKAIA, M. A.; KOZLOV, S. V. Inflammation and cancer: When NF- κ B amalgamates the perilous partnership. **Current Cancer Drug Targets**, v. 5, p. 325-44, 2005.
- DOMINGOS, M.O.; ANDRADE A, R.G.; BARBARO, K.C.; BORGES, M.M; LEWIS, D.J.; NEW, R.R. Influence of the A and B subunits of cholera toxin (CT) and Escherichia coli toxin (LT) on TNF- α release from macrophages. **Toxicon**, v.53, n.5, p.570-7, 2009.
- DONALDSON, D.S.; APOSTOLAKI, M.; BONE, H.K.; RICHARDS, C.M.; WILLIAMS, N.A. The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects from allergic airway disease development by inducing CD4⁺ regulatory T cells. **Mucosal Immunology**, v.6, p. 535-46, 2013.
- EDDAHRI, F.; DENANGLAIRE, S.; BUREAU, F.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W.J.; LEO, O.; ANDRIS, F. Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. **Blood**, v.113, n.11, p.2426-33, 2009.
- ELIAS, K.M.; LAURENCE, A.; DAVIDSON, T.S.; STEPHENS, G.; KANNO, Y.; SHEVACH, E.M.; O'SHEA, J.J. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. **BLOOD**, v.111, n.3, p.1013-20, 2008.
- ERTESVAG, A.; ENGEDAL, N.; NADERI, S.; BLOMHOFF, H.K. Retinoic Acid Stimulates the Cell Cycle Machinery in Normal T Cells: Involvement of Retinoic Acid Receptor-Mediated IL-2 Secretion. **The Journal of Immunology**, v.169, n.10, p.5555-63, 2002.
- ERTÜRKÜNER, S.P.; YAPRAK SARAÇ, E.; GÖÇMEZ, S.S.; EKMEKÇI, H.; ÖZTÜRK, Z.B; SEÇKİN, İ.; SEVER, Ö.; KESKINBORA, K. Anti-inflammatory and ultrastructural effects of Turkish propolis in a rat model of endotoxin-induced uveitis. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 54, n. 1, p. 49-57, 2016.
- FERRARI, M.; FORNASIERO, M.C.; ISETTA, A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. **Immunological Methods**, v.131, p.165-72, 1990.
- FREITAS, S. F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J. M.; GUIMARÃES, S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, p. 170-175, 2006.
- FUNAKOSHI-TAGO, M.; OHSAWA, K.; ISHIKAWA, T.; NAKAMURA, F.; UEDA, F.; NARUKAWA, Y.; KIUCHI, F.; TAMURA, H.; TAGO, K.; KASAHARA, T. Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v.40, p.550-60, 2016.

- GÁLVEZ, J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. **ISRN Inflammation**, v.2014, 2014.
- GEISSMANN, F.; AUFRAY, C.; PALFRAMAN, R.; WIRRIK, C.; CIOCCA, A.; CAMPISI, L.; NARNI-MANCINELLI, E.; LAUVAU, G. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. **Immunology and Cell Biology**, v.86, p. 398–408, 2008.
- GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v.19, p. 71–82, 2003.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.
- GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v.221, p.3-12, 2010.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.
- GU, J.; SHI, W.; LUA, Y.; ZHU, Q.; LU, H.; WANG, K.; NI, X.; LU, L.; WANG, X. All-trans retinoic acid favors the development and function of regulatory T cells from liver transplant patients. **International Immunopharmacology**, v.28, n.2, p.906–10, 2015.
- HAJISHENGALLIS, G.; NAWAR, H.; TAPPING, R.I; RUSSELL, M.W.; CONNELL, T.D. The Type II Heat-Labile Enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and Their Respective B Pentamers Differentially Induce and Regulate Cytokine Production in Human Monocytic Cells. **Infection And Immunity**, v.72, n.11, p.6351–8, 2004.
- HAN, D.C., HUANG, G.T.H., LIN, L.M., WARNER, N.A., GIM, J.S., JEWETT, A. Expression of MHC class II, CD70, CD80, CD86 and pro-inflammatory cytokines is differentially regulated in oral epithelial cells following bacterial challenge. **Oral Microbiology Immunology**, v. 18, p. 350-8, 2003.
- HARRIS, J.; DE HARO, S.A.; MASTER, S.S.; KEANE, J.; ROBERTS, E.A.; DELGADO, M.; DERETIC, V. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Immunity**, v.27, p.505-517, 2007.
- HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, p. 1-20, 2005.
- HELMBY, H.; GRENCIS, R. Interleukin 1 plays a major role in the development of Th2-mediated immunity. **European Journal of Immunology**, v.34, n.13, p.3674-81, 2004.
- HETTINGER, J.; RICHARDS, D. M.; HANSSON, J.; BARRA, M. M.; JOSCHKO, A. C.; KRIJGSVELD, J.; FEUERER, M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. **Nature immunology**, v. 14, n. 8, p. 821-830, 2013.
- HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 276–83, 2005.
- HUME, D. A. The many alternative faces of macrophage activation. **Frontiers in Immunology**, v.6, 2015.
- IVANOVSKA, N.D.; DIMOV, V.B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **Journal of Ethnopharmacology**, v.47, n.3, p.135–43, 1995.
- KHADER, S.A.; GAFFEN, S.L.; KOLLS, J.K. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. **Mucosal Immunol**, v. 2, n.5, p.403–11, 2009.

- KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; HATEM, A.M.; DE VRIES, P.J.; EL-SHAFEI, S.; KHATTAB, M.M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.17, n.1, p.93-102, 2003.
- KHAYYAL, M.T.; EL-HAZEK, R.M.; EL-GHAZALY, M.A. Propolis aqueous extract preserves functional integrity of murine intestinal mucosa after exposure to ionizing radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.40, n.3, p.901-6, 2015.
- 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.
- KORISH, A.A.; ARAFA, M.M. Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.15, n.4, p.332-8, 2011.
- KUBO, M.; MOTOMURA, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. **Frontiers in Immunology**, v.3, 2012.
- KULKARNI, P.; SHIRAISHI, T.; RAJAGOPALAN, K.; KIM, R.; MOONEY, S.M.; GETZENBERG, R.H. Cancer/testis antigens and urological malignancies. **Nature Reviews Urology**. v.9, n.7, p.386-96, 2012.
- LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v.6, 2005.
- LEE, H. W.; CHOI, H. J.; HA, S. J.; LEE, K. T.; KWON, Y. G. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1835, n. 2, p. 170-179, 2013.
- LI, Y.; ALAM, H.B. Creating a Pro-survival and Anti-inflammatory Phenotype by Modulation of Acetylation in Models of Hemorrhagic and Septic Shock. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.710, p.107–33, 2012.
- LIU, P.T.; KRUTZIK, S.R.; KIM, J.; MODLIN, R.L. Cutting edge: all-trans retinoic acid down-regulates TLR2 expression and function. **The Journal of Immunology**, v.174, n.5, p.2467-70, 2005.
- LIU, G.; YING, H.; ZENG, G.; WHEELER, C.J.; BLACK, K.L.; YU, J.S. HER-2, gp100, and MAGE-1 Are Expressed in Human Glioblastoma and Recognized by Cytotoxic T Cells. **Cancer Research**, v.64, n. 14, p.4980–6, 2004.
- LU, L., LAN, Q., LI, Z., ZHOU, X., GU, J., LI, Q., WANG, J., CHEN, M., LIU, Y., LU, L., SHEN, Y., BRAND, D.D., RYFFEL, B., HORWITZ, D.A., QUISMORIO, F.P., LIU, Z., LI, B., OLSEN, N.J., ZHENG, S.G. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. E3432-40, 2014.
- LUROSS, J.A.; HEATON, T.; HIRST, T.R.; DAY, M.J.; WILLIAMS, N.A. *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin B Subunit Prevents Autoimmune Arthritis Through Induction of Regulatory CD4⁺ T Cells. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 6, p.1671–82, 2002
- LUTZ, M.B. Induction of CD4⁺ Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells. **Immune Network**, v.16, n.1, p. 13-25, 2016.
- MA, X.; YAN, W.; ZHENG, H.; DU, Q.; ZHANG, L.; BAN, Y.; LI, N.; WEI, F. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000 research**, v.4, 2015.
- MANTEGAZZA, A.R.; MAGALHAES, J.G.; AMIGORENA, S.; MARKS, M.S. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. **Traffic**, v.14, p.135-52, 2013.

- MARTINEZ, F.O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.453-61, 2008.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.229-65, 2009.
- MEDZHITOV, R. Review: Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 135-45, 2001.
- MILLER, S.I.; ERNST, R.K.; BADER, M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.1, p.36-46, 2005.
- MINTERN, J.D.; VILLADANGOS, J.A. Autophagy and mechanisms of effective immunity. **Frontiers in Immunology**, v.3, 2012.
- MOHTY, M.; MORBELLI, S.; ISNARDON, D.; SAINTY, D.; ARNOULET, C.; GAUGLER, B.; OLIVE, D. All-trans retinoic acid skews monocyte differentiation into interleukin-12-secreting dendritic-like cells. **British Journal of Haematology**, v.122, n.5, p.829–36, 2003.
- MORA, J.R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U.H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.685-98, 2008.
- MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. **Science**, v.317, n. 5835, p.256-60, 2007.
- MUKHERJI, B.; CHAKRABORTY, N.G.; YAMASAKI, S. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A, v.92, n.17, p.8078-82, 1995.
- 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.
- NAITO, Y.; YASUMURO, M.; KONDOU, K.; OHARA, N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 452–56, 2007.
- NASHAR, T.O.; HIRST, T.R.; WILLIAMS, N.A. Modulation of B-cell activation by the B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. **Immunology**, v.91, n.4, p.572-8, 1997.
- NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.12, p.53-72, 2001.
- NAKASHIMA, K.; MURAKAMI, T.; TANABE, H.; INOUE, M. Identification of a naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, n.10, p.3034–41, 2014.
- NORTON, E.B., LAWSON, L.B., MAHDI, Z., FREYTAG, L.C., CLEMENTS, L.D. The A subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin functions as a mucosal adjuvant and promotes IgG2a, IgA, and Th17 responses to vaccine antigens. **Infection and Immunity**, v. 80, n.7, p. 2426–35, 2012.
- OKAMOTO, Y.; HARA, T.; EBATO, T.; FUKUI, T.; MASUZAWA, T. Brazilian propolis ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by inhibiting Th1 differentiation. **International Immunopharmacology**, v.16, p.178–83, 2013.

- OKAMOTO, Y.; TANAKA, M.; FUKUI, T.; MASUZAWA, T. Brazilian propolis inhibits the differentiation of Th17 cells by inhibition of interleukin-6-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.34, n.5, p.803-9, 2012.
- ORSATTI, C.L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., BACHIEGA, T.F., BÚFALO, M.C, ARAÚJO Jr., J., 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., 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.
- OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v.44, p. 375–378, 2001.
- PAGLIARONE, A.C.; MISSIMA, F.; ORSATTI, C.L.; BACHIEGA, T.F.; SFORCIN, J.M. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, p.230-3, 2009.
- PERRY, S. E.; MOSTAFA, S. M.; WENSTONE, R.; SHENKIN, A.; MCLAUGHLIN, P. J. Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? **Intensive care medicine**, v. 29, n. 8, p. 1245-1252, 2003.
- PINO-LAGOS, K.; GUO, Y.; NOELLE, R.J. Retinoic acid: A key player in immunity. **Biofactors**, v. 36, n.6, p. 430-6, 2010.
- RAPHAEL, I.; NALAWADE, S.; EAGAR, T.N.; FORSTHUBER, T.G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**. v.74, p.5-17, 2015.
- RAVIKUMAR, B.; SARKAR, S.; DAVIES, J.E.; FUTTER, M.; GARCIA-ARENCIBIA, M.; GREEN-THOMPSON, Z.W.; JIMENEZ-SANCHEZ, M.; KOROLCHUK, V.I.; LICHTENBERG, M.; LUO, S.; MASSEY, D.C.O.; MENZIES, F.M.; MOREAU, K.; NARAYANAN, U.; RENNA, M.; SIDDIQI, F.H.; UNDERWOOD, B.R.; WINSLOW, A.R.; RUBINSZTEIN, D.C. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 90, p.1383-435, 2010.
- RIFA'I, M.; WIDODO, N. Significance of propolis administration for homeostasis of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells controlling hyperglycemia. **SpringerPlus**, v.3, 2014.
- ROSENFELD, Y.; SHAI, Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 1513–22, 2006.
- SABUNCUOGLU, M.Z.; KISMET, K.; KILICOGLU, S.S.; KILICOGLU, B.; EREL, S.; MURATOGLU, S.; SUNAY, A.E.; ERDEMLI, E.; AKKUS, M.A. Propolis reduces bacterial translocation and intestinal villus atrophy in experimental obstructive jaundice. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.39, p.5226-31, 2007.
- SAITO, T.; FUJITA, N.; JANG, M.H.; UEMATSU, S.; YANG, B.G.; SATOH, T.; OMORI, H.; NODA, T.; YAMAMOTO, N.; KOMATSU, M.; TANAKA, K.; KAWAI, T.; TSUJIMURA, T.; TAKEUCHI, O.; YOSHIMORI, T.; AKIRA, S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. **Nature**, v.456, p.264-8, 2008.
- 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. 33-8, 2005.

- SALOMÃO, K.; De SOUZA, E.M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. Brazilian Green propolis: effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 185918-185929, 2011.
- SANTIAGO, K.B.; CONTI, B. J.; CARDOSO, E.O.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. **Pathogens and disease**. v.74, n.8, 2016.
- SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, n.5, p.878–88, 2011.
- SCHMITZ, J.; OWYANG, A.; OLDHAM, E.; SONG, Y.; MURPHY, E.; MCCLANAHAN, T.K.; ZURAWSKI, G.; MOSHREFI, M.; QIN, J.; LI, X.; GORMAN, D.M.; BAZAN, J.F.; KASTELEIN, R.A. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v.23, p.479–90, 2005.
- SENHAJI, N.; KOJOK, K.; DARIF, Y.; FADAINIA, C.; ZAID, Y. The Contribution of CD40/CD40L Axis in Inflammatory Bowel Disease: An Update. **Frontiers in Immunology**, v.6, 2015.
- SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy research**. v.30, n.6, p.894-905, 2016.
- SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 113, p. 1-14, 2007.
- SFORCIN, J.M., FERNANDES Jr., 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., 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.
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253-260, 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. 139-144, 2001.
- SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 762-774, 2011.
- SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; DE QUEIROZ, L.A.; PORTO, A.L. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 90–6, 2009.
- TAKEDA, K., AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, p. 1-14, 2005.
- TOWERS, C.G.; THORBURN, A. Therapeutic Targeting of Autophagy. **EBioMedicine**, v.14, p.15-23, 2016.
- TSAI, Y.C.; CHANG, H.W.; CHANG, T.T.; LEE, M.S.; CHU, Y.T.; HUNG, C.H. Effects of All-Trans Retinoic Acid on Th1- and Th2-Related Chemokines Production in Monocytes. **Inflammation**, v. 31, n. 6, p.428-33, 2008.

- TURCANU, V.; HIRST, T.R.; WILLIAMS, N.A. Modulation of human monocytes by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunit; altered cytokine production and its functional consequences. **Immunology**, v.106, p. 316–325, 2002.
- UEDA, Y.; SHIMIZU, K.; ITOH, T.; FUJI, N.; NAITO, K.; SHIOZAKI, A.; YAMAMOTO, Y.; SHIMIZU, T.; IWAMOTO, A.; TAMAI, H.; YAMAGISHI, H. Induction of Peptide-Specific Immune Response in Patients with Primary Malignant Melanoma of the Esophagus after Immunotherapy Using Dendritic Cells Pulsed with MAGE Peptides. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v.37, n.2, p.140–5, 2007.
- VALDOR, R.; MACIAN, F. Autophagy and the regulation of the immune response. **Pharmacological Research**, v.66, p.475-483, 2012.
- VAN LIMBERGEN, J.; STEVENS, C.; NIMMO, E.R.; WILSON, D.C.; SATSANGI, J. Autophagy: from basic science to clinical application. **Mucosal Immunology**, v.2, p. 315-30, 2009.
- XIAO, S.; JIN, H.; KORN, T.; LIU, S.M.; OUKKA, M.; LIM, B.; KUCHROO, V.K. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- β -driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. **The Journal of Immunology**, v.181, n.4, p.2277–84, 2008.
- XIONG, H.; PAMER, E. G. Monocytes and infection: Modulator, messenger and effector. **Immunobiology**, v. 220, p. 210–214, 2015.
- XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X.D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K.E.; EISSA, N.T. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. **Immunity**, v.27, n.1, p.135-44, 2007.
- WANG, J.; HUIZINGA, T.W.J.; TOES, R.E.M. De Novo Generation and Enhanced Suppression of Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells by Retinoic Acid. **The Journal of Immunology**, v.183, n.6, p.4119-26, 2009.
- WANG, K.; PING, S.; HUANG, S.; HU, L.; XUAN, H.; ZHANG, C; HU, F. Molecular mechanisms underlying the *in vitro* anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from Chinese propolis (poplar type). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, 2013.
- YANG, H.; GU, J.; ZHU, Q.; LU, H.; WANG, K.; NI, X.; LU, Y.; LU, L. Protection of acute GVHD by all-trans retinoic acid through suppression of T cell expansion and induction of regulatory T cells through IL-2 signaling. **International Immunopharmacology**, v. 28, p. 911–16, 2015.

**IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF PROPOLIS ON ANTIGEN
PRESENTATION BY HUMAN MONOCYTES**

Fernanda Lopes Conte^a, Karina Basso Santiago^a, Bruno José Conti^a, Eliza de Oliveira Cardoso^a, Lucas Pires Garcia Oliveira^a, Yahima Frión-Herrera^a, Marjorie de Assis Golim^b, Maria Teresa Cruz^c and José Maurício Sforcin^a

^aDepartment of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, Botucatu, SP, Brazil

^bFlow Cytometry Laboratory, Botucatu Blood Center, Medical School, Botucatu, SP, Brazil

^cCenter for Neurosciences and Cellular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

ABSTRACT

Objectives Propolis is a bee product that has been used since ancient times due its many biological properties, such as the immunomodulatory action. Monocytes are professional phagocytic cells that play an important role in immune response. This work aimed at investigating the modulatory action of propolis in the mechanisms involved in the antigen presentation by human monocytes.

Methods Cells were stimulated with retinoic acid (RA), B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (EtxB), human MAGE-1 and lipopolysaccharide (LPS), simultaneously or not with propolis. Cell surface markers expression was assessed by flow cytometry and cytokine production was determined by ELISA. Cells were also stimulated with rapamycin simultaneously or not to propolis, and gene expression was assessed by RT-qPCR.

Key findings Propolis alone maintained TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD40 and CD80 expression. Propolis in combination with MAGE-1 and LPS decreased the expression of CD40 stimulated by the antigens. Propolis maintained the action of RA on receptors expression. Propolis inhibited TNF- α (with EtxB and MAGE-1) and IL-6 (with AR and MAGE-1), and increased IL-10 (with MAGE-1) production. Propolis did not stimulate Beclin-1 and LC3-II gene expression. Propolis inhibited rapamycin-induced gene expression.

Conclusions Propolis exerted an immunomodulatory action in the presence of antigens, favoring anti-inflammatory responses. In addition, propolis effect on antigen presentation is independent of autophagy.

INTRODUCTION

Propolis is a resinous and balsamic product made by bees from different parts of plants, to which bees add salivary secretions, wax and pollen (Bankova, 2005). It is a lipophilic material, with aromatic and pleasant odor, and different colors (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). This product is composed by 50% resin, 30% beeswax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen and 5% of other substances, including debris (Burdock, 1998). However, its chemical composition is extremely complex, varying according to geographic location and local flora (Sforcin, 2016).

Propolis has been used in folk medicine since ancient times for various purposes, such as mummification of corpses, wound treatment, antipyretic agent, among others (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). It has been used until nowadays because of the many pharmacological properties such as antimicrobial, antitumor, antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory, due to its possible application in the pharmaceutical industry (Sforcin, 2016).

With regard to its immunomodulatory action, propolis can modulate the initial events of the immune response, inducing the expression of important molecules in the development of the immune response, such as Toll-like receptor (TLR) -2 and TLR-4 by macrophages (Orsatti *et al.* 2010), the co-stimulatory molecule CD80 and pro and anti-inflammatory cytokines by monocytes (Búfalo *et al.*, 2014), activating the factor nuclear kappa B by dendritic cells (Conti *et al.*, 2016), and increasing the production of antibodies (Sforcin *et al.*, 2005).

Our group has been investigating propolis action on human monocytes, which are professional phagocytes derived from hematopoietic progenitors of myeloid origin (Hume, 2015). Monocytes are present in the blood and are rapidly recruited to sites of injury or infection, differentiating into macrophages in the tissues or migrating directly to the lymph nodes (Geissmann *et al.*, 2008). Monocytes have an important role in homeostasis, removing apoptotic cells and toxic components of the organism, as well as in the immune response, acting as antigen-presenting cells (Auffray *et al.*, 2009). Monocytes exhibit TLRs, which recognize microorganisms through the detection of conserved microbial products or structures – the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Medzhitov, 2001). They also express molecules of the major histocompatibility complex (MHC) that present peptides to T

lymphocytes, and co-stimulatory molecules, such as CD40 and CD80, which provide a second signal for lymphocytes activation, besides releasing cytokines that determine the profile generated after lymphocyte activation (Medzhitov, 2001; Han *et al.*, 2003).

TLR activation may also induce another pathway that favors antigen presentation: the autophagy (Xu *et al.*, 2007; Delgado & Deretic, 2009). This is a catabolic process responsible for degrading cytoplasmic structures within the lysosome (Ravikumar *et al.*, 2010). Autophagy is important to maintain cellular homeostasis, eliminating damaged structures, recycling cellular components, besides being an alternative mechanism to obtain energy in the prolonged absence of nutrients (Valdor & Macian, 2012). It also participates of the immune response, regulating both innate and adaptive immunity (Deretic, 2011), being especially important for the capture of structures located in the cytosol, helping to eliminate intracellular microorganisms (Deretic & Levine, 2009). Autophagy is considered a "second chance" for peptide generation to MHC-II, since many phagocytosed bacteria eject virulence factors out of the phagosome, and some of them have the ability to escape from the phagosome to the cytosol (Mantegazza *et al.*, 2013).

In addition to their role in antigen recognition, monocytes play also a key role in the activation of primary T cells and the development of memory T cells. Thus, naive helper T (Th) cells can be differentiated into effector subtypes such as Th1, Th2, Th17 and regulatory T (Treg), that have divergent functions, leading to inflammation or tolerance, triggering protective or pathogenic immune responses (Geissmann *et al.*, 2008).

The aim of this work was investigate the modulatory action of propolis in the mechanisms involved in antigen presentation in order to investigate whether propolis could favor a response profile. Human monocytes were stimulated with different antigens concomitantly or not with propolis: 1) retinoic acid (RA), an immunomodulatory agent and establishes a non-inflammatory environment, mainly by the induction of regulatory T cells (Pino-Lagos *et al.*, 2010); 2) B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (EtxB) was used as infectious agent able to suppress Th1 responses and to induce B cell activation (Bone *et al.*, 2002; Turcanu *et al.*, 2002); 3) a tumor antigen (human MAGE-1), identified in melanoma and other types of tumors and target for cancer immunotherapy (Büeler & Mulligan, 1996); 4) lipopolysaccharide (LPS), a Th17 response inducer (Gálvez, 2014). In addition, we aimed to evaluate whether propolis could modulate the autophagy process, as an alternative form of antigen presentation.

MATERIALS AND METHODS

PROPOLIS SAMPLE AND ANTIGENS

Propolis was collected in the Beekeeping Section, UNESP, Campus of Botucatu. It was ground and 30% ethanolic extracts of propolis were prepared, 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) (Sforcin *et al.*, 2005).

Propolis composition was previously analysed by gas chromatography–mass spectrometry, and its main compounds groups were benzoic acid, dihydrocinnamic acid, coumaric acid, caffeic acid, prenyl-p-coumaric acid, flavonoids, artepillin C, trihydroxymethoxy flavonon, tetrahydroxy flavonon and triterpenes (Conti *et al.*, 2015a).

Propolis was diluted in RPMI 1640 culture medium (Cultilab, Brazil) containing L-glutamine (0.1 g/l), sodium bicarbonate (2.2 g/l), non-essential amino acids (10 ml/l) and supplemented with 10% fetal calf serum (complete RPMI). Dilutions were prepared for each assay in order to obtain 5 and 25 µg/ml of propolis. The same procedure was carried out with propolis solvent (70% ethanol), to obtain the respective concentration of alcohol found in the higher concentration of propolis.

RA (Cayman Chemical, USA) was diluted in DMSO to obtain the 10^{-8} and 10^{-7} M concentrations. EtxB (Sigma-Aldrich, USA) was diluted in ultrapure water to obtain 2 and 10 µg/ml. LPS, from *Escherichia coli* 026:B6 (Sigma-Aldrich, USA), was diluted in complete RPMI to obtain 1 and 5 µg/ml. Human MAGE-1 (Enzo Life Science, USA) was diluted in complete RPMI to obtain 2 and 10 µg/ml.

HUMAN MONOCYTES ISOLATION AND CULTURE

Heparinized venous blood was obtained from 5 healthy adult volunteers and centrifuged in the presence of Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden – density = 1.077) to obtain the peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Briefly, 20 ml of heparinized blood were added to an equal volume of RPMI. Samples were added to Ficoll-Paque and centrifuged at 400g for 30 min at room temperature. The interface layer of the PBMC was aspirated and washed twice with RPMI at 300g for 10 min. Monocytes were counted using 0.02% neutral red staining and were resuspended at a final concentration of 1×10^6 monocytes/ml in complete RPMI. Monocytes were incubated at 37°C and 5% CO₂ for

90 min. Non-adherent cells were removed and monocytes were incubated with the stimuli (table 1 and 2) for 24 h for analysis of cell viability, cell surface markers and cytokines, and for 4 h for expression of autophagy-related transcripts.

This study was approved by the Ethics Committee of Botucatu Medical School (CAAE: 42600915.0.0000.5411). An informed consent was signed by all the blood donors.

Table 1. Treatments of monocytes for analysis of cell viability, cell surface markers and cytokines

C	Control (culture medium)
P5	Propolis 5 µg/ml
P25	Propolis 25 µg/ml

R1	RA 10 ⁻⁸ M
R1P5	RA 10 ⁻⁸ M + Propolis 5 µg/ml
R1P25	RA 10 ⁻⁸ M + Propolis 25 µg/ml
R2	RA 10 ⁻⁷ M
R2P5	RA 10 ⁻⁷ M + Propolis 5 µg/ml
R2P25	RA 10 ⁻⁷ M + Propolis 25 µg/ml

E2	EtxB 2 µg/ml
E2P5	EtxB 2 µg/ml + Propolis 5 µg/ml
E2P25	EtxB 2 µg/ml + Propolis 25 µg/ml
E10	EtxB 10 µg/ml
E10P5	EtxB 10 µg/ml + Propolis 5 µg/ml
E10P25	EtxB 10 µg/ml + Propolis 25 µg/ml

L1	LPS 1 µg/ml
L1P5	LPS 1 µg/ml + Propolis 5 µg/ml
L1P25	LPS 1 µg/ml + Propolis 25 µg/ml
L5	LPS 5 µg/ml
L5P5	LPS 5 µg/ml + Propolis 5 µg/ml
L5P25	LPS 5 µg/ml + Propolis 25 µg/ml

M2	MAGE 2 µg/ml
M2P5	MAGE 2 µg/ml + Propolis 5 µg/ml
M2P25	MAGE 2 µg/ml + Propolis 25 µg/ml
M10	MAGE 10 µg/ml
M10P5	MAGE 10 µg/ml + Propolis 5 µg/ml
M10 P25	MAGE 10 µg/ml + Propolis 25 µg/ml

Table 2. Treatments of monocytes for analysis of autophagy-related transcripts

C	Control (culture medium)
P	Propolis 25 µg/ml
P+R	Propolis 25 µg/ml + Rapamycin 800 nM
R	Rapamycin 800 nM

CELL VIABILITY

Cell viability was performed using 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT – Sigma-Aldrich, USA) colorimetric assay.

Monocytes (1 x 10⁶ cells/ml) were incubated with propolis, antigens and its combinations (Table 1) for 24 h at 37°C and 5% CO₂ in a final volume of 100 µl. The

supernatants were removed and 100 µl of MTT (1 mg/ml) in complete RPMI were added to the culture cells for 3 h. Afterwards, MTT was aspirated and 100 µl of dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, USA) was added to dissolve the formazan salt. The absorbance was recorded at 540 nm and the percentage of cell viability was calculated using the formula: (OD test/OD control) x 100.

CELL SURFACE MARKER EXPRESSION

The expression of TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD40 and CD80 by human monocytes was assessed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA).

Monocytes (1×10^6 cells/ml) were incubated with propolis, antigens and its combinations (Table 1) for 24 h at 37°C and 5% CO₂ into polystyrene tubes for cytometric analysis (BD Labware, USA). Cells were washed and incubated with monoclonal antibodies according to the manufacturer's instructions: anti-CD14- PE/Cy7 (clone M5E2), anti-TLR-2-FITC (clone TLR2.1), anti-TLR-4-PE (clone HTA125), anti-HLA-DR-FITC (clone L243), anti-CD40-APC (clone 5C3) and anti-CD80-PE (clone 2D10). Stained cells were incubated for 30 min in the dark at 4°C, then washed and fixed with 5% paraformaldehyde in PBS. Control isotypic was carried out incubating isotypic antibodies labelled with fluorochromes of the respective tests. Antibodies were purchased from Biolegend (USA).

In each sample 15.000 events were analysed using the CellQuest Software (Cell Quest Software, USA). Data were shown as percentage (%) of cells that expressed the markers in the surface, obtained for the gated CD14-positive cells.

CYTOKINE QUANTIFICATION

The production of TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-12 was measurement by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's guidelines (R&D Systems, USA).

After monocytes (1×10^6 cells/ml) incubation with propolis, antigens and its combinations (Table 1) for 24 h at 37°C and 5% CO₂, the supernatants were harvested. Briefly, a 96-well flat-bottom Nunc MaxiSorp (Nunc/Apogent, Thermo Fisher Scientific, USA) was coated with a 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 respective wells. Following washes, the cytokine was detected using the specific

conjugated detection antibody. The substrate reagent was added into each well, and after color development, plates were read at 450 nm using an ELISA plate reader.

EXPRESSION OF TRANSCRIPTS RELATED TO AUTOPHAGY

The quantification of the genes encoding the proteins Beclin-1 and LC3-II was carried out using the reaction technique in quantitative Polymerase Chain in real time (RT-qPCR).

Monocytes (1×10^6 cells/ml) were incubated with propolis, rapamycin (autophagy inducer) and their combination (Table 2) for 4 h at 37°C and 5% CO₂. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Sigma-Aldrich, USA) according to manufacturer's instructions. After, total RNA was incubated with RNase-free DNase (Promega, USA) to remove the genomic DNA. RNA quantification of each sample was determined by spectrophotometry, using the equipment NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). Subsequently, was performed the synthesis of complementary DNA (cDNA), using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, USA), according to manufacturer's protocol.

The reactions contained 0,4 µl of each primer, forward and reverse (Table 3), 2 µL of cDNA, 10 µL of GoTaq-qPCR Master Mix (Promega, USA) and 7,2 µL of nuclease-free water. In addition, a control was included in each reaction in order to prove that there was no contamination. The conditions for the RT-qPCR reactions were: initial denaturation at 96°C – 2 min and then 40 cycles at 95°C - 15s and 60°C - 60s, followed by a melting curve, using 7500 Fast Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA).

Expression values of the transcripts were normalized based on the concurrent analysis of the expression of the enzyme encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH). The calculation of the differential expression of selected genes was carried out by the data processing method compared to a standard curve (Larionov *et al.*, 2005). A control RNA sample received the value of 100 to analyze the relative expression of the other samples.

Table 3. Primers for autophagy gene expression and GAPDH.

TARGET	FORWARD PRIMER (5'- 3')	REVERSE PRIMER (5'- 3')	GENEBANK
Beclin-1	(101)GTAGACCGGACTTGGGTGAC(120)	(198)CATGGTGCTGTTGTTGGACG(179)	NM_003766.3
LC3-II	(517)CCAGGAAACCTTCGGCTTCT(536)	(632)CGGTAGAGGCAGCTCAGTTC(613)	NM_032514.3
GAPDH	(684)CGTGGAAGGACTCATGACCA(703)	(801)GGCAGGGATGATGTTCTGGA(782)	NM_002046.4

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analysed by Graph Pad statistical software (Graph Pad Software, USA). Analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test were employed. Data were expressed as mean \pm standard deviation of 5 individuals and differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

CELL VIABILITY

Monocyte viability was not affected after incubation with propolis and its solvent - 70% ethanol (data not shown).

Both concentrations of RA slightly reduced cell viability. EtxB reduced the viability of monocytes only at the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. Both concentrations of LPS e MAGE-1 reduced cell viability. DMSO and ultrapure water – RA and EtxB solvents, respectively – did not affect cell viability (data not shown).

The combination of RA 10^{-7} M to propolis was similar to control. EtxB in combination with propolis exerted no cytotoxic effects. LPS combined with propolis was similar to control, but not LPS 5 $\mu\text{g/ml}$ + propolis 5 $\mu\text{g/ml}$. The combination of MAGE-1 and propolis was similar to control (data not shown). Table 4 shows only the significant differences in cell viability comparing to control.

Table 4. Viability (%) of human monocytes (1×10^6 cells/ml) stimulated for 24 h with culture medium (Control), antigens (RA, EtxB, LPS and MAGE-1) and its combination with propolis, as shown in table 1. Data represent mean and standard deviation ($n = 5$). Significantly different from control: * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.001$); *** ($P < 0.0001$).

TREATMENTS	VIABILITY (%)
Control	100.0 \pm 0.0
RA 10^{-8} M	81.36 \pm 18.61*
RA 10^{-8} M + P 5 $\mu\text{g/ml}$	83.95 \pm 15.09*
RA 10^{-8} M + P 25 $\mu\text{g/ml}$	83.82 \pm 19.86*
RA 10^{-7} M	83.27 \pm 18.08*
EtxB 10 $\mu\text{g/ml}$	86.03 \pm 16.59*
LPS 1 $\mu\text{g/ml}$	82.63 \pm 19.60**
LPS 5 $\mu\text{g/ml}$	84.10 \pm 14.90*
LPS 5 $\mu\text{g/ml}$ + P 5 $\mu\text{g/ml}$	86.18 \pm 11.97*
MAGE-1 2 $\mu\text{g/ml}$	81.50 \pm 13.15***
MAGE-1 10 $\mu\text{g/ml}$	85.78 \pm 13.64**

EXPRESSION OF CELL SURFACE MARKERS

RA decreased the expression of TLR-2 induced by propolis. RA (R2) and one of the combinations (R1P5) decreased CD40 expression. RA alone in both concentrations (R1 and R2) did not affect CD80 expression. However, the combinations with the lowest concentration of propolis (A1P5 and A2P5) decreased CD80 expression (Figure 1). TLR-4 and HLA-DR expression was not altered by RA alone or in combination (data not shown).

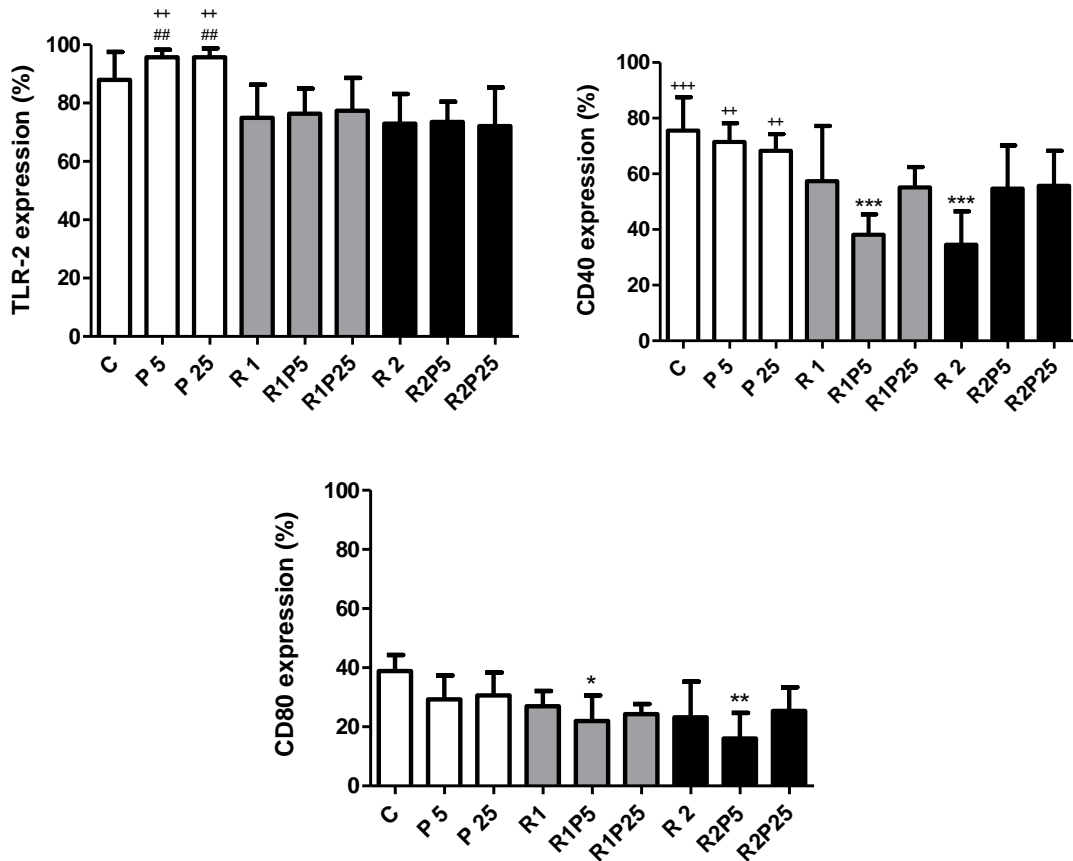


Figure 1. Percentage (%) of expression of TLR-2, CD40 and CD80 by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 $\mu\text{g/ml}$ (P5), propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ (P25), retinoic acid 10^{-8} M (R1), retinoic acid 10^{-8} M + propolis 5 $\mu\text{g/ml}$ (R1P5), retinoic acid 10^{-8} M + propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ (R1P25), retinoic acid 10^{-7} M (R2), retinoic acid 10^{-7} M + propolis 5 $\mu\text{g/ml}$ (R2P5), retinoic acid 10^{-7} M + propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ (R2P25). Data represent mean and standard deviation ($n = 5$). Significantly different from control (C): * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.001$); *** ($P < 0.0001$). Significantly different from RA 10^{-8} M (R1): ## ($P < 0.001$). Significantly different from RA 10^{-7} M (R2): ++ ($P < 0.001$); +++ ($P < 0.0001$).

Propolis in combination with EtxB (E2P25) decreased the percentage of TLR-4 expression compared to the toxin alone (E2). EtxB induced a higher CD80 expression (E2 and

E10) compared to control and propolis. Propolis reduced CD40 (E10P25) and CD80 (E2P25, E10P5 and E10P25) expression induced by EtxB (Figure 2). The expression of TLR-2 and HLA-DR was not altered by the treatments (data not shown).

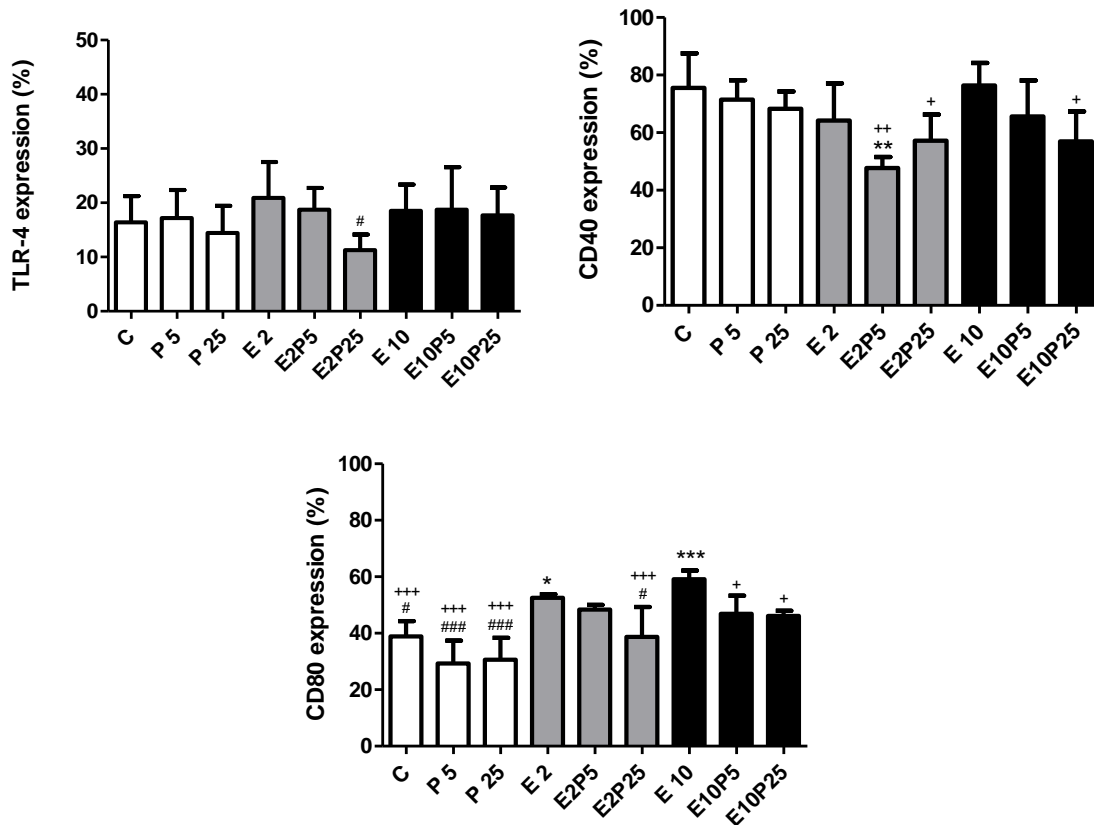


Figure 2. Percentage (%) of expression of TLR-4, CD40 and CD80 by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 µg/ml (P5), propolis 25 µg/ml, EtxB 2 µg/ml (E2), EtxB 2 µg/ml + propolis 5 µg/ml (E2P5), EtxB 2 µg/ml + propolis 25 µg/ml (E2P25), EtxB 10 µg/ml (E10), EtxB 10 µg/ml + propolis 5 µg/ml (E10P5), EtxB 10 µg/ml + propolis 25 µg/ml (E10P25). Data represent mean and standard deviation (n = 5). Significantly different from control (C): * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.001$); *** ($P < 0.0001$). Significantly different from EtxB 2 µg/ml (E2): # ($P < 0.05$); ### ($P < 0.0001$). Significantly different from EtxB 10 µg/ml (E10): + ($P < 0.05$); ++ ($P < 0.001$); +++ ($P < 0.0001$).

The combination of propolis and LPS reduced CD40 expression (L1P5 and L1P25) compared to control and LPS (L1) alone. With respect the CD80, LPS increased the expression of this receptor, and propolis maintained LPS-induced effects, although propolis alone induced a lower expression of CD80 (Figure 3). The expression of TLR-2, TLR-4 and HLA-DR was not altered by these treatments (data not shown).

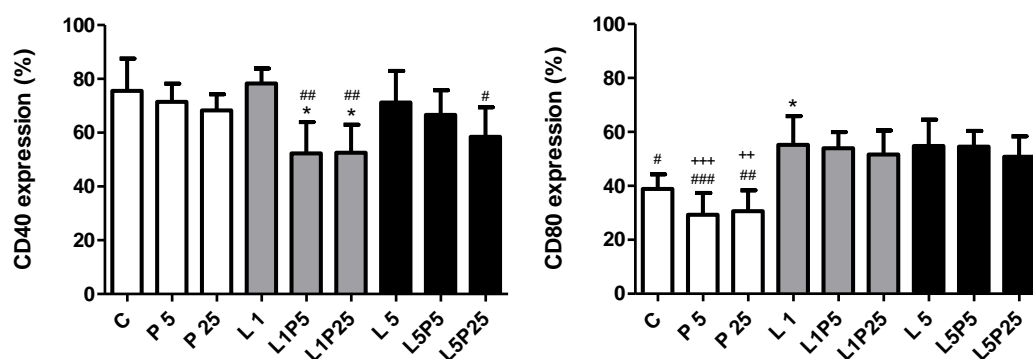


Figure 3. Percentage (%) of expression of CD40 and CD80 by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 µg/ml (P5), propolis 25 µg/ml, LPS 1 µg/ml (L1), LPS 1 µg/ml + propolis 5 µg/ml (L1P5), LPS 1 µg/ml + propolis 25 µg/ml (L1P25), LPS 5 µg/ml (L5), LPS 5 µg/ml + propolis 5 µg/ml (L5P5), LPS 5 µg/ml + propolis 25 µg/ml (L5P25). Data represent mean and standard deviation ($n = 5$). Significantly different from control (C): * ($P < 0.05$). Significantly different from LPS 1 µg/ml (L1): # ($P < 0.05$); ## ($P < 0.001$); ### ($P < 0.0001$). Significantly different from LPS 5 µg/ml (L5): ++ ($P < 0.001$); +++ ($P < 0.0001$).

The higher concentration of propolis in combination with MAGE-1 (M2P25 and M10P25) decreased CD40 expression. Propolis induced a lower expression of CD80 compared to MAGE-1 alone but the combinations showed no difference in CD80 expression compared to control and antigen alone (Figure 4). The expression of TLR-2, TLR-4 and HLA-DR was not altered (data not shown).

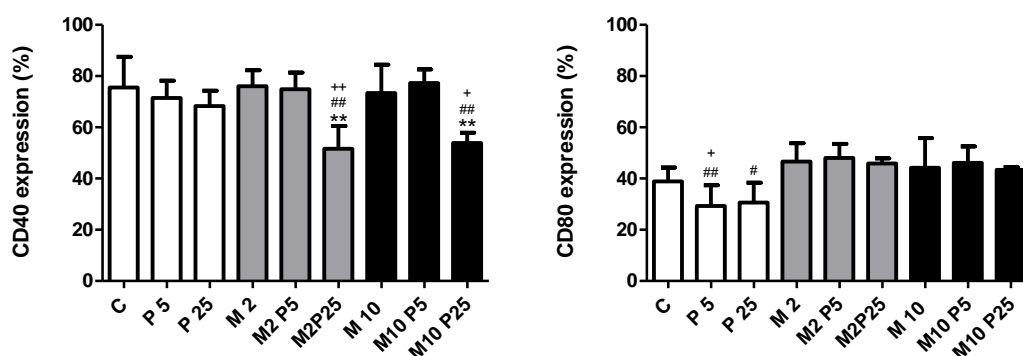


Figure 4. Percentage (%) of expression of CD40 and CD80 by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 µg/ml (P5), propolis 25 µg/ml, MAGE 2 µg/ml (M2), MAGE 2 µg/ml + propolis 5 µg/ml (M2P5), MAGE 2 µg/ml + propolis 25 µg/ml (M2P25), MAGE 10 µg/ml (M10), MAGE 10 µg/ml + propolis 5 µg/ml (M10P5), MAGE 10 µg/ml + propolis 25 µg/ml (M10P25). Data represent mean and standard deviation ($n = 5$). Significantly different from control (C): ** ($P < 0.001$). Significantly different from MAGE 2 µg/ml (M2): # ($P < 0.05$); ## ($P < 0.001$). Significantly different from MAGE 10 µg/ml (10): + ($P < 0.05$); ++ ($P < 0.001$).

CYTOKINE PRODUCTION

IL-12 was not detected in this study, under the conditions of our assays.

No alterations were seen in IL-10 production by human monocytes stimulated with RA in combination or not to propolis (data not shown). RA decreased TNF- α production compared to propolis action alone, and the combination with propolis maintained the inhibitory effect of RA on TNF- α production. RA (R1) induced a higher production of IL-6, but its combination with propolis (R1P5 and R1P25) inhibited its production stimulated by RA, and the levels were similar to that induced by propolis alone (P5 and P25) (Figure 5).

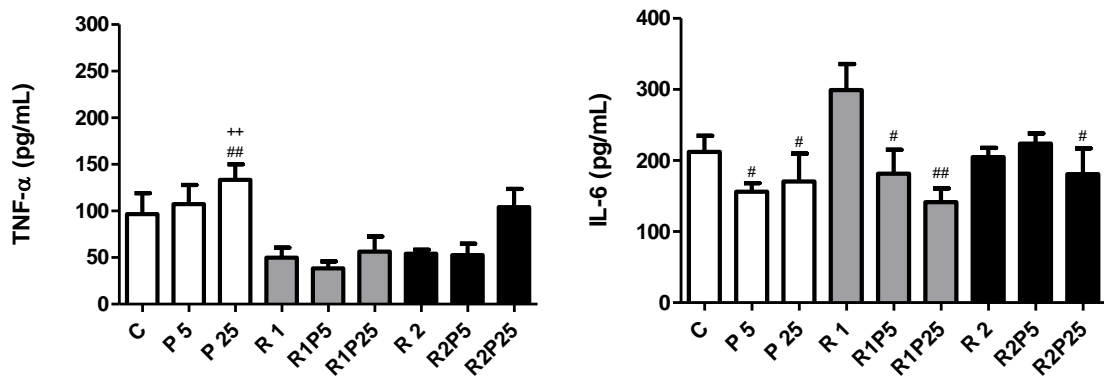


Figure 5. TNF- α and IL-6 production (pg/ml) by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 $\mu\text{g/ml}$ (P5), propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ (P25), retinoic acid 10^{-8} M (R1), retinoic acid 10^{-8} M + propolis 5 $\mu\text{g/ml}$ (R1P5), retinoic acid 10^{-8} M + propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ (R1P25), retinoic acid 10^{-7} M (R2), retinoic acid 10^{-7} M + propolis 5 $\mu\text{g/ml}$ (R2P5), retinoic acid 10^{-7} M + propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ (R2P25). Data represent mean and standard deviation ($n = 5$). Significantly different from RA 10^{-8} M (R1): # ($P < 0.05$); ## ($P < 0.001$). Significantly different from RA 10^{-7} M (R2): ++ ($P < 0.001$).

The combination of propolis with EtxB suppressed the production of TNF- α induced by the toxin (E2P25 and E10P5). The lower concentration of EtxB (E2) induced a higher IL-6 production compared to the higher concentration (E10), which in combination or not with propolis decreased the production of this cytokine (Figure 6).

No significant differences were seen in IL-10 production (data not shown).

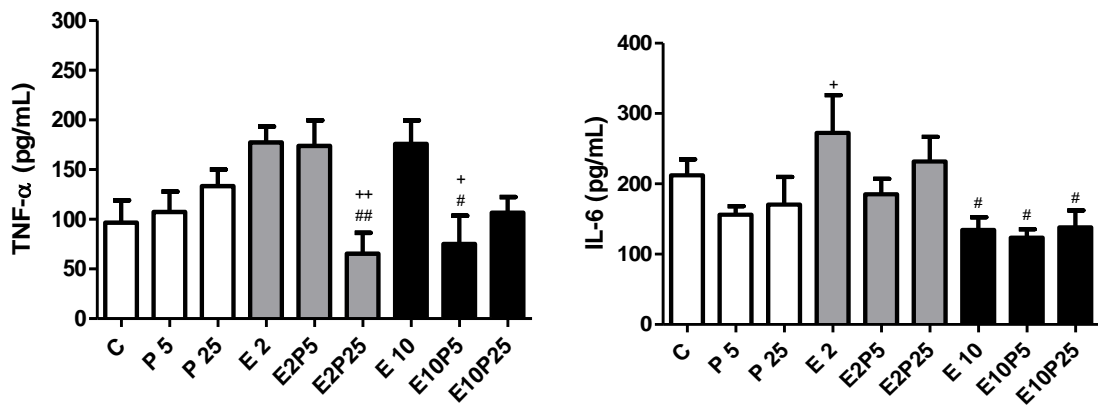


Figure 6. TNF- α and IL-6 production (pg/ml) by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 μ g/ml (P5), propolis 25 μ g/ml, EtxB 2 μ g/ml (E2), EtxB 2 μ g/ml + propolis 5 μ g/ml (E2P5), EtxB 2 μ g/ml + propolis 25 μ g/ml (E2P25), EtxB 10 μ g/ml (E10), EtxB 10 μ g/ml + propolis 5 μ g/ml (E10P5), EtxB 10 μ g/ml + propolis 25 μ g/ml (E10P25). Data represent mean and standard deviation ($n = 5$). Significantly different from EtxB 2 μ g/ml (E2): # ($P < 0.05$); ## ($P < 0.001$). Significantly different from EtxB 10 μ g/ml (E10): + ($P < 0.05$); ++ ($P < 0.001$).

LPS stimulated IL-6 and IL-10 production, and the combinations with propolis were similar to LPS alone (Figure 7). TNF- α production was not altered by these treatments (data not shown).

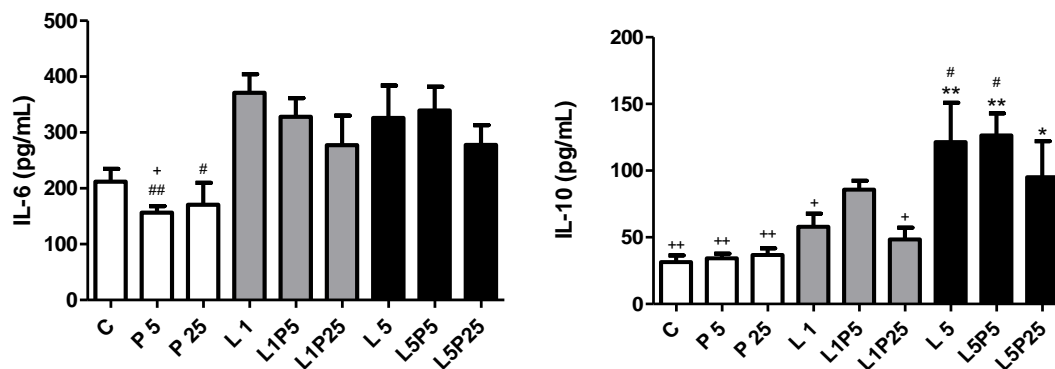


Figure 7. IL-6 and IL-10 production (pg/ml) by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 μ g/ml (P5), propolis 25 μ g/ml, LPS 1 μ g/ml (L1), LPS 1 μ g/ml + propolis 5 μ g/ml (L1P5), LPS 1 μ g/ml + propolis 25 μ g/ml (L1P25), LPS 5 μ g/ml (L5), LPS 5 μ g/ml + propolis 5 μ g/ml (L5P5), LPS 5 μ g/ml + propolis 25 μ g/ml (L5P25). Data represent mean and standard deviation ($n = 5$). Significantly different from control (C): * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.001$). Significantly different from LPS 1 μ g/ml (L1): # ($P < 0.05$); ## ($P < 0.001$). Significantly different from LPS 5 μ g/ml (L5): + ($P < 0.05$); ++ ($P < 0.001$).

MAGE-1 induced the production of proinflammatory cytokines: TNF- α (M2 and M10) and IL-6 (M2), while MAGE-1 alone did not stimulate IL-10 release (M2 and M10). However, propolis inhibited the production of TNF- α (M2P5) and IL-6 (M2P5 and M2P25) induced by MAGE-1, and increased IL-10 production in combination with the higher antigen concentration (M10P5 and M10P25) (Figure 8).

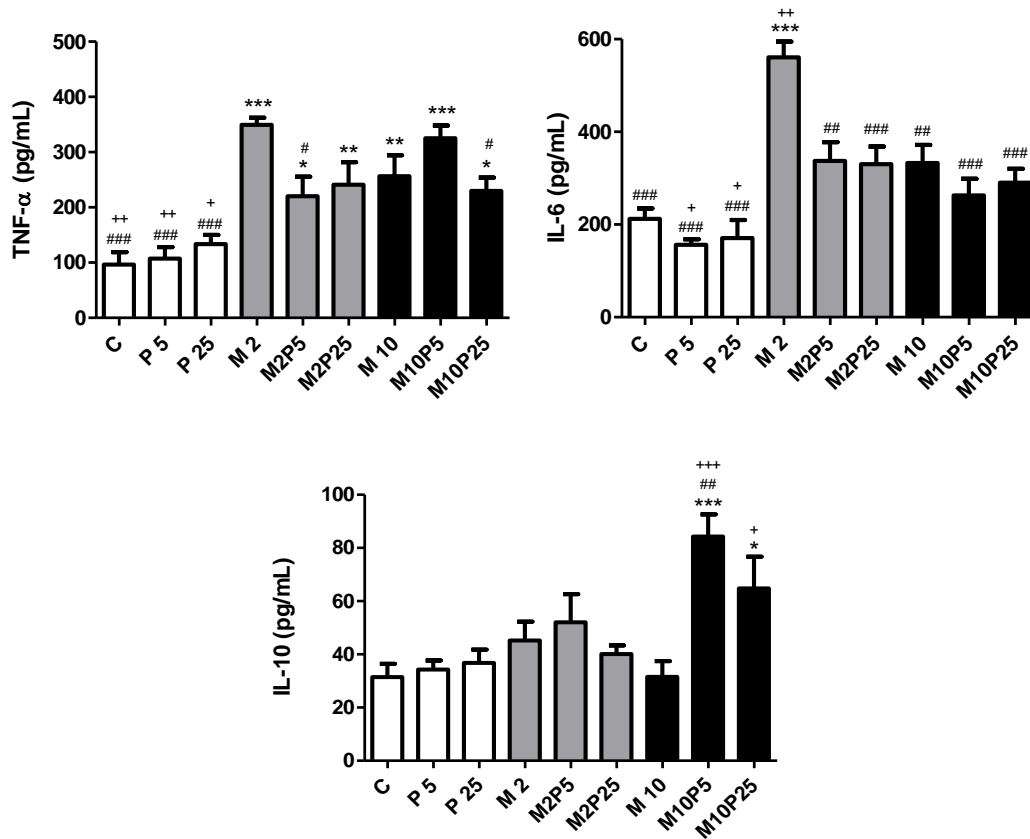


Figure 8. TNF- α , IL-6 and IL-10 production (pg/ml) by human monocytes (1×10^6 células/ml) stimulated for 24 h with culture medium (C), propolis 5 μ g/ml (P5), propolis 25 μ g/ml, MAGE 2 μ g/ml (M2), MAGE 2 μ g/ml + propolis 5 μ g/ml (M2P5), MAGE 2 μ g/ml + propolis 25 μ g/ml (M2P25), MAGE 10 μ g/ml (M10), MAGE 10 μ g/ml + propolis 5 μ g/ml (M10P5), MAGE 10 μ g/ml + propolis 25 μ g/ml (M10P25). Data represent mean and standard deviation (n = 5). Significantly different from control (C): * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.001$); *** ($P < 0.0001$). Significantly different from MAGE 2 μ g/ml (M2): # ($P < 0.05$); ## ($P < 0.001$); ### ($P < 0.0001$). Significantly different from MAGE 10 μ g/ml (10): + ($P < 0.05$); ++ ($P < 0.001$); +++ ($P < 0.0001$).

EXPRESSION OF AUTOPHAGY-RELATED GENES

Propolis alone did not alter the expression of genes encoding Beclin-1 and LC3-II proteins, which was similar to untreated cells. The treatment of monocytes with rapamycin

induced significantly the expression of both genes. However, the combination P+R induced a lower expression than rapamycin alone (Figure 9).

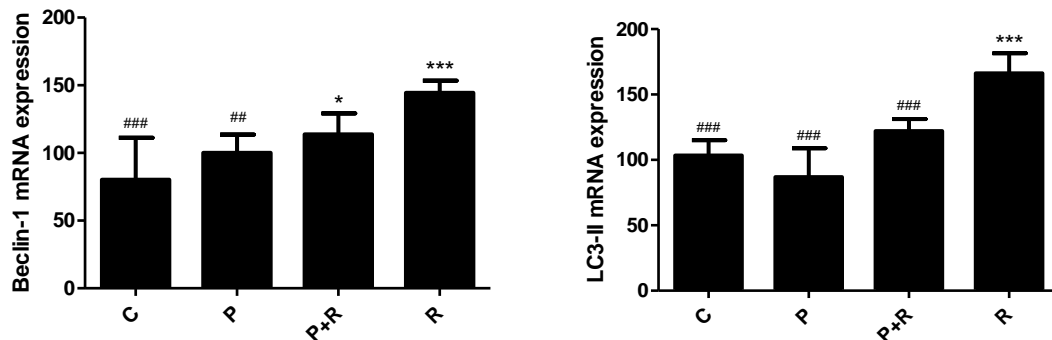


Figure 9. Expression of genes encoding Beclin-1 and LC3-II proteins in human monocytes (1×10^6 cells/ml) incubated with culture medium (C), propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ (P), propolis 25 $\mu\text{g/ml}$ + rapamycin 800 nM (P + R) and rapamycin 800 nM (R) for 4 h. Data represent mean and standard deviation (n = 5). Significantly different from control (C): *($P < 0.05$); ***($P < 0.0001$). Significantly different from rapamycin (R): ##($P < 0.001$), ###($P < 0.0001$).

DISCUSSION

Monocyte viability was not affected after incubation with propolis and 70% ethanol. Other authors, using the same propolis sample, observed no cytotoxic effects of propolis and its diluent on human monocytes, using concentrations up to 100 $\mu\text{g/ml}$ (Búfalo *et al.*, 2014; Conti *et al.*, 2015b; Santiago *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2017). Although antigens decreased monocyte viability, the mean was $> 80\%$ in all treatments, what is considered a representative value for biological tests so that they were used in all assays.

Propolis alone maintained the basal expression of TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD40 and CD80 receptors by human monocyte, concluding that propolis did not affect the expression of cellular receptors in the absence of antigenic stimulation. No alterations were seen in HLA-DR expression for all the treatments, compared to the control. HLA-DR is constitutively expressed by human monocytes from healthy individuals, and its expression is essential for the antigen presentation to CD4^+ T lymphocytes, and low levels of HLA-DR expression are associated with high mortality (Perry *et al.*, 2003).

RA decreased the TLR-2 expression induced by propolis. Other authors observed that treatment of human monocytes with RA reduced TLR-2 expression and modulated their activation. Although TLR activation is essential for defense against pathogens, it may lead to inflammation and tissue damage, suggesting that the downregulation of the TLR-2 expression

is a mechanism by which RA exert its anti-inflammatory action (Liu *et al.*, 2005). According to our data, propolis maintained the suppressive function in TLR-2 induced by RA. Combinations of the lowest concentration of propolis with RA resulted in a decreased CD80 expression. Propolis was able to upregulate CD80 expression by human monocytes only in a high concentration (100 µg/ml) (Búfalo *et al.*, 2014), demonstrating that propolis immunomodulatory effect is dose-dependent.

Propolis in combination with EtxB decreased TLR-4 expression that was induced by the toxin alone. However, previous data obtained of our group showed that lower concentrations of propolis were able to upregulate TLR-4 expression by human monocytes (Búfalo *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016), confirming that the modulation is dependent of propolis concentration. Propolis in combination with EtxB reduced CD80 expression induced by toxin, what can be explained by the presence of cinnamic acid in our sample, which has already been described by reducing CD80 expression (Conti *et al.*, 2013).

In combination with inflammatory stimuli (LPS and MAGE-1), propolis decreased CD40 expression induced by the antigens alone. Despite the importance of CD40-CD40L in the development of appropriate immune responses, it is also associated with several pathological processes, such as oxidative stress, autoimmune and inflammatory diseases. Therapies with antibodies that block this binding are being investigated for treat inflammatory diseases (Senhaji *et al.*, 2015). Thus, a downregulated CD40 expression can be a possible mechanism of propolis action for cell deactivation in inflammatory processes.

Regarding to cytokines, the decreased TNF- α production by monocytes treated with RA confirm the inhibitory action of RA on Th1 cytokines production (Mohty *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2006); in addition, the combination with propolis supports this inhibitory effect. RA induced the IL-6 production, a cytokine involved in the development of Th17 cells, which generates responses implicated in inflammatory conditions (Chen *et al.*, 2011; Raphael *et al.*, 2015). Nevertheless, data from the literature have shown that even under IL-6 stimulus, RA is able to suppress Th17 induction (Lu *et al.*, 2014; Mucida *et al.*, 2007), what may be due to the inhibition of IL-6 receptor induced by RA (Xiao *et al.*, 2008). In addition to the role in the transition from innate to acquired immune response, IL-6 also acts in inflammatory processes and is produced early in inflammation (Scheller *et al.*, 2011). Since the combination with propolis reduced the IL-6 production, the use of this natural product may be an interesting strategy to control inflammatory conditions.

IL-6 is involved in B cells activation and consequently in antibodies secretion (Eddahri *et al.*, 2009). EtxB has been studied as a vaccine adjuvant, because of its ability to increase antibody production (Bone *et al.*, 2002). According to our results, the lower concentration of the toxin could be more efficient in inducing the secretion of antibodies via IL-6, since it induced higher production of this cytokine. Propolis in combination with the toxin suppressed the TNF- α production, demonstrating that propolis may favor an anti-inflammatory status.

LPS increased IL-6 production, confirming the potential of LPS for Th17 polarization, an important response in the intestinal mucosa (Gálvez, 2014). Thus, the maintenance of this cytokine level by propolis in combination with LPS indicates that the use of propolis may be important to protect intestinal mucosa against infectious processes and microbiota deregulation. LPS in the bloodstream may be detrimental to the host and the development of an anti-inflammatory response is necessary (Li & Alam, 2012). Other authors have demonstrated the anti-inflammatory effect of propolis and its compounds in response to LPS (Blonska *et al.*, 2004, Korish & Arafa, 2011, Ertürküner *et al.*, 2016; Funakoshi-Tago *et al.*, 2016).

Our data also demonstrated that propolis in combination with MAGE-1 inhibited the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) and increased the production of IL-10, an immunosuppressive cytokine (Raphael *et al.*, 2015). Thus, under these conditions, propolis induced a deactivating profile, which may be important to avoid damage to the host.

Taken together, one may verify that propolis in combination with different antigens exerts an anti-inflammatory profile, what is in agreement with data from literature (Hu *et al.*, 2005; Naito *et al.* 2007; 2007; Búfalo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Cavendish *et al.*, 2015; Khayyal *et al.*, 2003).

We also aimed to investigate whether autophagy could be modulated by propolis, since this a pathway that provides peptides for antigen presentation (Ravikumar *et al.*, 2010). Propolis treatment did not induce autophagy, what is a relevant finding, since this pathway should occur only under certain conditions, such as nutrient deprivation and infectious processes, and should be inhibited under normal conditions (Ravikumar *et al.*, 2010). As expected, rapamycin treatment induced the expression of both genes, confirming the proper standardization of our assays. However, in combination with rapamycin, propolis exerted an inhibitory effect in autophagy.

Cytokines of Th2 profile, such as IL-4 and IL-13, and the activation of CD40 may inhibit autophagy (Andrade *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2007; Deretic & Levine, 2009). Since propolis in combination to antigens reduced CD40 expression, these results provide evidences for the propolis inhibitory role in the autophagy, via inhibition of CD40 and induction of a Th2 response.

Autophagy inhibition may also be related to the induction of inflammasome, a multiprotein cytosolic complex responsible for the detection of cytoplasmatic PAMPs (Abdelaziz *et al.*, 2015). Since our propolis sample inhibited autophagy, one may speculate that it may probably induce inflammasome, which is an important pathway in defense against pathogens, stress conditions, tissue damage, in response to vaccine adjuvants, etc. In addition, cytokines involved in the inflammasome activation (IL-1 β , IL-18 and IL-33) can favor antigen presentation or contribute directly to T and B cell activation (Martinon *et al.*, 2009), being able to promote Th2 polarization (Helmbj & Grecis, 2004; Schmitz *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2001). Thus, despite being considered an inflammatory pathway, the inflammasome may favor the development of Th2 responses (Martinon *et al.*, 2009), corroborating with the anti-inflammatory action of propolis.

CONCLUSION

Propolis exerted an immunomodulatory action in the presence of antigens, favoring anti-inflammatory responses. In addition, the modulatory effect of propolis on the antigenic presentation is independent of autophagy.

DECLARATIONS

CONFLICT OF INTEREST

The Authors declare that they have no conflict of interests to disclose.

FUNDING

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 301925/2013-5), and Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP – 2015/03493-3).

REFERENCES


- ABDELAZIZ, D.H.A.; KHALIL, H.; CORMET-BOYAKA, E.; AMER, A.O. The cooperation between the autophagy machinery and the inflammasome to implement an appropriate innate immune response: do they regulate each other? **Immunological Reviews**, v.265, p.194-204, 2015.
- ANDRADE, R.M.; WESSENDARP, M.; GUBBELS, M.J.; STRIEPEN, B.; SUBAUSTE, C.S. CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, p.2366-77, 2006.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v.27, p. 669–92, 2009.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 29-32, 2005.
- BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.P.; SCHELLER, S.; KROL,W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.25–30, 2004.
- BONE, H.; ECKHOLDT, S.; WILLIAMS, N.A. Modulation of B lymphocyte signalling by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **International Immunology**, v.14, n.6, p.647-58, 2002.
- BÜELER, H., MULLIGAN, R.C. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1. **Molecular Medicine**, v. 2, p. 545-55, 1996.
- BÚFALO, M.C., FERREIRA, I., COSTA, G., FRANCISCO, V., LIBERAL, J., CRUZ, M.T., LOPES, M.C., BATISTA, M.T., SFORCIN, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-κB and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 84-92, 2013.
- BÚFALO, M.C., BORDON-GRACIANI, A.P., CONTI, B.J., GOLIM, M.A., SFORCIN, J.M. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1497-504, 2014.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-63, 1998.
- CARDOSO, E.O.; CONTI, B. J; SANTIAGO, K.B.; CONTE, F.L.; OLIVEIRA, L.P.G; HERNANDES, R.T.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.69, p.99-108, 2017.
- CAVENDISH, R.L., SANTOS, J.S.; NETO, R. B.; PAIXÃO, A.O.; OLIVEIRA, J.V.; DIVINO ARAUJO, E.D.; SILVA, A.A.B.; THOMAZZI, S.M.; CARDOSO J, C.; GOMES, M.Z. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.173, p.127-33, 2015.
- CHEN, Z; LIN, F; GAO, Y; LI, Z; ZHANG, J; XING, Y; DENG, Z; YAO, Z; TSUN, A; LI, B. FOXP3 and RORγt: Transcriptional regulation of Treg and Th17. **International Immunopharmacology**, v.11, p.536–42, 2011.
- CONTI, B.J.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Chemical composition of the same Brazilian propolis sample analyzed in 1997 and in 2012: no freezing effect. **Natural Product Communications**. v.10, p. 1279–1280, 2015a
- 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. 1-7, 2013.

- CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; BÚFALO, M. C.; HERRERA, Y. F.; ALDAY, E.; VELAZQUEZ, C.; HERNANDEZ, J.; SFORCIN, J. M. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1431-1438, 2015b.
- CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; CARDOSO E.O.; FREIRE, P.P.; CARVALHO, R.F.; GOLIM, M.A.; SFORCIN, J.M. Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF-κB activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2016.
- DAWSON, H.D.; COLLINS, G.; PYLE, R.; KEY, M.; WEERARATNA, A.; DEEP-DIXIT, V.; NADAL, C.N.; TAUB, D.D. Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. **BMC Immunology**, v.7, 2006.
- DELGADO, M.A.; DERETIC, V. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n.7, p.976-983, 2009.
- DERETIC, V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. **Immunological Reviews**, v.240, p.92-104, 2011.
- DERETIC, V.; LEVINE, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. **Cell Host & Microbe**, v.5, p.527-54, 2009.
- EDDAHRI, F.; DENANGLAIRE, S.; BUREAU, F.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W.J.; LEO, O.; ANDRIS, F. Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities. **Blood**, v.113, n.11, p.2426-33, 2009.
- ERTÜRKÜNER, S.P.; YAPRAK SARAÇ, E.; GÖÇMEZ, S.S.; EKMEKÇI, H.; ÖZTÜRK, Z.B; SEÇKIN, İ.; SEVER, Ö.; KESKINBORA, K. Anti-inflammatory and ultrastructural effects of Turkish propolis in a rat model of endotoxin-induced uveitis. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 54, n. 1, p. 49-57, 2016.
- FUNAKOSHI-TAGO, M.; OHSAWA, K.; ISHIKAWA, T.; NAKAMURA, F.; UEDA, F.; NARUKAWA, Y.; KIUCHI, F.; TAMURA, H.; TAGO, K.; KASAHARA, T. Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v.40, p.550-60, 2016.
- GÁLVEZ, J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. **ISRN Inflammation**, v.2014, 2014.
- GEISSMANN, F.; AUFRAY, C.; PALFRAMAN, R.; WIRRIK, C.; CIOCCA, A.; CAMPISI, L.; NARNI-MANCINELLI, E.; LAUVAU, G. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. **Immunology and Cell Biology**, v.86, p. 398-408, 2008.
- HAN, D.C., HUANG, G.T.H., LIN, L.M., WARNER, N.A., GIM, J.S., JEWETT, A. Expression of MHC class II, CD70, CD80, CD86 and pro-inflammatory cytokines is differentially regulated in oral epithelial cells following bacterial challenge. **Oral Microbiology Immunology**, v. 18, p. 350-8, 2003.
- HARRIS, J.; DE HARO, S.A.; MASTER, S.S.; KEANE, J.; ROBERTS, E.A.; DELGADO, M.; DERETIC, V. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **Immunity**, v.27, p.505-517, 2007.
- HELMBY, H.; GRENCIS, R. Interleukin 1 plays a major role in the development of Th2-mediated immunity. **European Journal of Immunology**, v.34, n.13, p.3674-81, 2004.
- HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 276-83, 2005.
- HUME, D. A. The many alternative faces of macrophage activation. **Frontiers in Immunology**, v.6, 2015.
- KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S.; HATEM, A.M.; DE VRIES, P.J.; EL-SHAFEI, S.; KHATTAB, M.M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.17, p.93-102, 2003.

- KORISH, A.A.; ARAFA, M.M. Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.15, n.4, p.332-8, 2011.
- LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v.6, 2005.
- LI, Y.; ALAM, H.B. Creating a Pro-survival and Anti-inflammatory Phenotype by Modulation of Acetylation in Models of Hemorrhagic and Septic Shock. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.710, p.107–33, 2012.
- LIU, P.T.; KRUTZIK, S.R.; KIM, J.; MODLIN, R.L. Cutting edge: all-trans retinoic acid down-regulates TLR2 expression and function. **The Journal of Immunology**, v.174, n.5, p.2467-70, 2005.
- LU, L., LAN, Q., LI, Z., ZHOU, X., GU, J., LI, Q., WANG, J., CHEN, M., LIU, Y., LU, L., SHEN, Y., BRAND, D.D., RYFFEL, B., HORWITZ, D.A., QUISMORIO, F.P., LIU, Z., LI, B., OLSEN, N.J., ZHENG, S.G. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. E3432-40, 2014.
- MANTEGAZZA, A.R.; MAGALHAES, J.G.; AMIGORENA, S.; MARKS, M.S. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. **Traffic**, v.14, p.135-52, 2013.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.229-65, 2009.
- MEDZHITOV, R. Review: Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 135-45, 2001.
- MOHTY, M.; MORBELLI, S.; ISNARDON, D.; SAINTY, D.; ARNOULET, C.; GAUGLER, B.; OLIVE, D. All-trans retinoic acid skews monocyte differentiation into interleukin-12-secreting dendritic-like cells. **British Journal of Haematology**, v.122, n.5, p.829–36, 2003.
- MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. **Science**, v.317, n. 5835, p.256-60, 2007.
- NAITO, Y.; YASUMURO, M.; KONDOU, K.; OHARA, N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 452–56, 2007.
- NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.12, p.53-72, 2001.
- ORSATTI, C.L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., BACHIEGA, T.F., BÚFALO, M.C, ARAÚJO Jr., J., SFORCIN, J.M Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1141-6, 2010.
- PERRY, S. E.; MOSTAFA, S. M.; WENSTONE, R.; SHENKIN, A.; MCLAUGHLIN, P. J. Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? **Intensive care medicine**, v. 29, n. 8, p. 1245-1252, 2003.
- PINO-LAGOS, K.; GUO, Y.; NOELLE, R.J. Retinoic acid: A key player in immunity. **Biofactors**, v. 36, n.6, p. 430-6, 2010.
- RAPHAEL, I.; NALAWADE, S.; EAGAR, T.N.; FORSTHUBER, T.G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v.74, p.5-17, 2015.
- RAVIKUMAR, B.; SARKAR, S.; DAVIES, J.E.; FUTTER, M.; GARCIA-ARENCEBIA, M.; GREEN-THOMPSON, Z.W.; JIMENEZ-SANCHEZ, M.; KOROLCHUK, V.I.; LICHTENBERG, M.; LUO, S.; MASSEY, D.C.O.; MENZIES, F.M.; MOREAU, K.; NARAYANAN, U.; RENNA, M.; SIDDIQI, F.H.; UNDERWOOD, B.R.; WINSLOW, A.R.; RUBINSZTEIN, D.C. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 90, p.1383-435, 2010.

- SANTIAGO, K.B.; CONTI, B. J.; CARDOSO, E.O.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. **Pathogens and disease**. v.74, n.8, 2016.
- SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, n.5, p.878–88, 2011.
- SCHMITZ, J.; OWYANG, A.; OLDHAM, E.; SONG, Y.; MURPHY, E.; MCCLANAHAN, T.K.; ZURAWSKI, G.; MOSHREFI, M.; QIN, J.; LI, X.; GORMAN, D.M.; BAZAN, J.F.; KASTELEIN, R.A. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v.23, p.479–90, 2005.
- SENHAJI, N.; KOJOK, K.; DARIF, Y.; FADAINIA, C.; ZAID, Y. The Contribution of CD40/CD40L Axis in Inflammatory Bowel Disease: An Update. **Frontiers in Immunology**, v.6, 2015.
- SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy research**. v.30, n.6, p.894-905, 2016.
- 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.
- SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- TURCANU, V.; HIRST, T.R.; WILLIAMS, N.A. Modulation of human monocytes by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunit; altered cytokine production and its functional consequences. **Immunology**, v.106, p. 316–325, 2002.
- VALDOR, R.; MACIAN, F. Autophagy and the regulation of the immune response. **Pharmacological Research**, v.66, p.475-483, 2012.
- XIAO, S.; JIN, H.; KORN, T.; LIU, S.M.; OUKKA, M.; LIM, B.; KUCHROO, V.K. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- β -driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. **The Journal of Immunology**, v.181, n.4, p.2277–84, 2008.
- XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X.D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K.E.; EISSLER, N.T. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. **Immunity**, v.27, n.1, p.135-44, 2007.
- WANG, K.; PING, S.; HUANG, S.; HU, L.; XUAN, H.; ZHANG, C; HU, F. Molecular mechanisms underlying the in vitro anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from Chinese propolis (poplar type). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, 2013.

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**

O(A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa “**AÇÃO IMUNOMODULADORA DA PRÓPOLIS NA APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA**”, 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 20 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) 3880-1608/1609.

Informamos que o Senhor 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.

Concordo em participar da pesquisa:

Nome e assinatura do sujeito de pesquisa: _____

Local e data: _____

Fernanda Lopes Conte
Mestranda em Biologia Geral e Aplicada
IB – UNESP – Campus de Botucatu

Prof. Adj. José Maurício Sforcin
Responsável pelo Projeto
Depto. Microbiologia e Imunologia
IB – UNESP – Campus de Botucatu