



unesp

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



PG-BGA

POSSÍVEL AÇÃO CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DA GEOPRÓPOLIS ASSOCIADA À DOXORRUBICINA SOBRE MONÓCITOS HUMANOS

LUCAS PIRES GARCIA OLIVEIRA

Material apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biomoléculas – Estrutura e Função, Instituto de
Biociências, UNESP, Câmpus de Botucatu, para
realização da defesa de tese, nível: mestrado

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin

Co-orientador: Dr. Bruno José Conti

BOTUCATU – SP

2018



unesp

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



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

POSSÍVEL AÇÃO CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DA
GEOPRÓPOLIS ASSOCIADA À DOXORRUBICINA SOBRE
MONÓCITOS HUMANOS

LUCAS PIRES GARCIA OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

CO-ORIENTADOR: DR. BRUNO JOSÉ CONTI

Material apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biomoléculas – Estrutura e Função, Instituto de
Biociências, UNESP, Câmpus de Botucatu, para
realização da defesa de tese, nível: mestrado

BOTUCATU – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Lucas Pires Garcia.

Possível ação imunomoduladora da geoprópolis associada à doxorrubicina sobre monócitos humanos / Lucas Pires Garcia Oliveira. - Botucatu, 2018

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

Orientador: José Maurício Sforcin

Coorientador: Bruno José Conti

Capes: 21100004

1. Geoprópolis. 2. Imunomodulação. 3. Preparações farmacêuticas. 4. Monocitos. 5. Citotoxicidade.

Palavras-chave: citotoxicidade ; geoprópolis; imunomodulação; monócito; quimioterápico .

Agradecimentos

A meus pais por me oferecerem todo o amparo necessário para que eu chegasse até onde estou, sem eles eu não seria a pessoa que hoje me tornei.

A meu orientador, José Maurício Sforcin, pelos anos de apoio e ensinamentos que me levaram a construir meu caráter científico e pessoal.

A todos do laboratório, Bruno, Karina, Eliza, Fernanda, Dolly, que me acompanharam na rotina do laboratório, me ensinando, discutindo e me ajudando a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao departamento de Microbiologia e Imunologia por toda a infraestrutura, e pelos alunos e docentes que fazem parte do nosso dia-a-dia.

A Pós-Graduação por fornecer todo o amparo burocrático e na resolução de dúvidas durante esses 2 anos de mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo pela bolsa de mestrado concedida (2016/02249-4) que possibilitou a execução deste projeto.

A todos aqueles que passaram ao meu lado nos últimos anos me apoiando, me mostrando o lado bom das coisas, me incentivando a sempre ser uma pessoa melhor e a seguir em frente pois o mundo é grande e as possibilidades são infinitas.

“O VALOR DAS COISAS NÃO ESTÁ NO TEMPO QUE ELAS DURAM, MAS
NA INTENSIDADE COM QUE ACONTECEM. POR ISSO, EXISTEM
MOMENTOS INESQUECÍVEIS, COISAS INEXPLICÁVEIS E PESSOAS
INCOMPARÁVEIS.”

(FERNANDO PESSOA)

Lista de abreviaturas

APC: Antigen presenting cell
CD: Cluster of differentiation
DC: Dendritic cell
DCF: Diclorofluoresceína
DCF-DA: Diclorofluoresceína diacetato
DMSO: Dimetilsulfóxido
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
FSC: Forward scatter
HLA: Human leukocyte antigen
IKB α : I kappa B alfa
IL: Interleucine
LPS: Lipopolissacarídeo
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MDR: Multi drug resistance
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF- κ B: Nuclear factor kappa B
NLR: Nod-like Receptor
PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS: Phosphate buffered saline
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
PMA: Phorbol myristate acetate
PLC γ : Fosfolipase C γ
PVDF: Polyvinylidene difluoride
RIPA: Radio immunoprecipitation assay
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis
TLR: Toll-like receptor
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TNFR: Tumor necrosis factor receptor
TRAF: TNF receptor associated factor

RESUMO

O câncer é uma doença que atinge pessoas em diversos continentes, acarretando milhões de mortes anualmente. Os tratamentos antineoplásicos são conhecidos por sua ampla lista de efeitos colaterais como toxicidade, indução de resistência em células tumorais, falta de seletividade entre células normais e tumorais, além de acometimento do sistema imunológico com consequente aparecimento de infecções. Com o intuito de atenuar os efeitos colaterais causados pelos agentes antitumorais, a administração de produtos naturais concomitantemente com fármacos tem sido investigada. O presente trabalho foi delineado visando elucidar a possível ação citotóxica e imunomoduladora da geoprópolis (GEO) associada à doxorrubicina (DOX) em menor concentração sobre monócitos de indivíduos saudáveis. A análise da viabilidade celular foi realizada pelo método do MTT, a produção de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10) por ELISA, a expressão de marcadores de superfície (HLA-DR, CD80, CD40, TLR-2, TLR-4) por citometria de fluxo. Também foi avaliada a atividade microbicida de monócitos frente ao desafio com *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, a expressão gênica por RT-PCR e a produção de proteínas por western blot. O ensaio de MTT demonstrou que nenhum dos tratamentos apresentou ação citotóxica. Monócitos incubados com GEO e com a associação GEO + DOX apresentaram produção de TNF- α e IL-10 aumentada, e produção de IL-1 β e IL-6 diminuídas. Houve aumento na expressão de TLR-4 e CD80 após incubação com a associação, enquanto a GEO isoladamente induziu somente aumento da expressão de TLR-4. A ação bactericida dos monócitos foi aumentada frente ao desafio com *E. coli*. A atividade fungicida não sofreu alterações significativas pelos diferentes tratamentos, assim como a atividade microbicida contra *S. mutans*. A expressão gênica de LC3 e NF- κ B foi inibida por todos os tratamentos, enquanto a expressão de fosfo-I κ B α foi diminuída pela GEO, mas a associação manteve os níveis basais. Nossos dados permitem concluir que a associação não é citotóxica para monócitos humanos e possui ação imunomoduladora quanto à expressão de marcadores de superfície celular e produção de citocinas, sugerindo um possível perfil ativador da associação. Como implicações práticas, a utilização da associação permitiria reduzir a concentração de uso da doxorrubicina e os efeitos adversos causados pelo tratamento quimioterápico.

Palavras-chave: geoprópolis; quimioterápico; monócito; citotoxicidade; imunomodulação.

ABSTRACT

Cancer is a disease that strikes people on many continents, resulting in millions of deaths annually. The antineoplastic treatments are known for their wide range of side effects such as toxicity, induction of resistance in tumor cells, lack of selectivity between normal and tumor cells, as well as immunosuppression with consequent onset of infections. In order to mitigate the side effects caused by antitumor agents, the administration of natural products concomitantly with drugs has been investigated. The present work was designed to elucidate a possible cytotoxic and immunomodulatory action of geopropolis (GEO) combined with doxorubicin (DOX) in a lower concentration on monocytes of healthy individuals. Cell viability was analyzed by the MTT method, the expression of surface markers (HLA-DR, CD80, CD40, TLR-2, TLR-4) by flow cytometry, the production of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10) by ELISA, gene expression by RT-PCR, protein production by western blot. The microbicidal activity of monocytes was evaluated against *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*, as well as hydrogen peroxide production. MTT assay showed that none of the treatments exerted a cytotoxic action. Monocytes incubated with GEO and the GEO + DOX had an increased TNF- α and IL-10 production, while IL-1 β and IL-6 production decreased when compared to control. An increased TLR-4 and CD80 expression was seen after incubation with the combination, whereas GEO alone increased TLR-4 expression. The combination increased the bactericidal action of monocytes against *E. coli*. No alterations were found in the fungicidal activity nor in the bactericidal activity against *S. mutans*. Gene expression of LC3 and NF- κ B were decreased by all treatments, whereas phospho-I κ B α expression was decreased by GEO but the association maintained baseline levels. Our findings indicated that the combination was not cytotoxic for monocytes and exerted an immunomodulatory action on the expression of cell surface markers and cytokine production, suggesting an activator profile of GEO + DOX. The use of this combination could reduce the concentration of DOX and the side effects caused by chemotherapy.

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. JUSTIFICATIVA DO PROJETO.....	16
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Obtenção das amostras de geoprópolis.....	17
4.2. Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e da solução de doxorubicina.....	17
4.3. Obtenção de monócitos humanos.....	18
4.4. Avaliação da viabilidade celular.....	18
4.5. Avaliação de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo.....	19
4.6. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA.....	20
4.7. Extração de RNA.....	20
4.8. Expressão gênica.....	20
4.9. Western blot.....	21
4.10. Atividade microbica de monócitos.....	22
4.11. Produção de peróxido de hidrogênio.....	23
4.12. Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Viabilidade celular.....	24
5.2. Expressão de marcadores de superfície celular.....	25
5.3. Produção de citocinas.....	28

5.4.	Expressão gênica e western blot para avaliação da via do NF-kB e LC3.....	33
5.5.	Atividade microbici.....	36
5.6.	Produção de peróxido de hidrogênio.....	39
6.	CONCLUSÃO.....	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
	Manuscrito.....	50
	Anexo 1.....	74

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que atinge pessoas em diversos continentes, acarretando milhões de mortes anualmente. Cerca de 13 milhões de novos casos foram notificados em 2008 e aproximadamente 7 milhões de mortes foram decorrentes de câncer, principalmente em países em desenvolvimento (FERLAY *et al.*, 2010) O câncer de mama tem sido o maior responsável por mortes entre as mulheres e o câncer de pulmão o primeiro entre os homens, associados principalmente à hábitos como tabagismo e ingestão de bebidas alcoólicas, dentre outros fatores (FERLAY *et al.*, 2010; JEMAL *et al.*, 2011). FORSEA *et al.* (2012) relataram que a incidência de melanoma variou entre os países europeus, sendo a maior prevalência na Suíça (19,2%) e as menores na Romênia e Grécia (2,8 e 2,2%, respectivamente). A Sociedade Americana do Câncer (ACS) previu em 2017 cerca de 1,6 milhões de novos casos de câncer e 600.000 mortes decorrentes da doença. Apesar da alta incidência, tais dados representam uma estabilização na incidência em mulheres e queda no número de homens acometidos. O estudo previu que o câncer de pulmão seria responsável pelo maior número de mortes independente do sexo, sendo o câncer de mama o maior responsável por mortes entre as mulheres e o de próstata entre os homens (ACS, 2017).

No Brasil, a estimativa para 2014 e 2015 era de cerca de 576 mil novos casos diagnosticados de câncer. Foram feitas previsões para 19 diferentes tipos de câncer e, assim como no estudo norte-americano, o câncer mais prevalente no sexo feminino seria o de mama (75 mil novos casos) e nos homens o de próstata (69 mil novos casos). Apesar dos altos números, a estimativa de novos casos de câncer de pulmão (27 mil) e colo de útero (15 mil) representa uma diminuição de novos diagnósticos, devido às campanhas de prevenção e detecção de câncer (FACINA, 2014). De acordo com as previsões para 2016/2017, o Brasil deverá registrar 596 mil casos de câncer: entre os homens, são esperados 295.200 casos, e entre as mulheres, 300.800 (INCA, 2016). O quadro da doença e as previsões para 2016 mostram que esta doença atinge a população como um todo, sendo necessárias mais pesquisas sobre a biologia dos tumores e tratamentos eficazes, que possam abranger a população afetada pelo câncer.

Com relação à terapêutica, o tratamento antitumoral consiste tradicionalmente na remoção cirúrgica da massa tumoral e no uso de fármacos antitumorais, na impossibilidade da intervenção cirúrgica ou como adjuvante. Apesar de o tratamento quimioterápico ser amplamente utilizado e apresentar efeitos colaterais, a sobrevida é variada entre os pacientes e em lugares distintos: pacientes oncológicos em países desenvolvidos possuem maior taxa de

sobrevida em comparação aos indivíduos de países subdesenvolvidos, devido principalmente às condições do sistema de saúde e acesso a informação (FERLAY *et al.*, 2010). Os agentes antitumorais podem agir de várias maneiras, inibindo o processo carcinogênico e a proliferação celular, e são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação e estrutura química.

Os agentes alquilantes causam danos diretamente no DNA, pois seu grupo alquil se liga covalentemente ao DNA ou à proteínas, interferindo em sua ação e impedindo a replicação celular. Esses fármacos agem em todas as fases do ciclo celular e são utilizados para o tratamento de muitos cânceres diferentes, incluindo leucemia, linfoma, doença de Hodgkin, entre outros. Dentre os agentes alquilantes, temos a cisplatina, carboplatina e lomustine (SIDDIK, 2005). A carboplatina se intercala no DNA, formando ligações cruzadas e interferindo em sua função (HO *et al.*, 2003). Este fármaco é um análogo da cisplatina de segunda geração e apresenta baixa toxicidade. Por este motivo, tem sido escolhido para tratamento de pacientes que sofrem com a toxicidade da cisplatina (LOKICH & ANDERSON, 1998).

Os fármacos antimetabólitos interferem em processos metabólicos normais no interior da célula. Um dos antimetabólitos mais conhecidos é o metotrexato, o qual é um inibidor da dihidrofolato redutase, inibindo o metabolismo do ácido fólico (WOOD & WU, 2015). É um composto antiproliferativo e imunossupressor, utilizado no tratamento de vários tipos de tumores, embora acarrete efeitos colaterais que compreendem desde náuseas e vômitos até cirrose, hepatite e anemia.

Os inibidores das topoisomerasas interferem na ação dessas enzimas, as quais desempenham um importante papel na replicação do DNA. A camptotecina é um antineoplásico que foi isolado pela primeira vez da casca de uma árvore chinesa, a *Camptotheca acuminata*. As camptotecinas possuem características farmacológicas distintas, inibindo principalmente a ação da topoisomerase I, tornando-a citotóxica. Os inibidores da topoisomerase I atuam danificando a replicação do DNA na fase S do ciclo celular (POMMIER *et al.*, 1999).

Os inibidores de mitose muitas vezes são alcaloides derivados de plantas e outros compostos oriundos de produtos naturais. Agem principalmente induzindo parada da mitose na fase M do ciclo celular, mas também podem agir em outras fases inibindo a proliferação celular. Nessa classe, temos os inibidores de microtúbulos e de cinases. Os taxanos e os alcaloides da vinca são os dois grupos mais antigos de inibidores de segmentação dos microtúbulos. Ambos compostos impedem a conclusão do ciclo celular pela sua junção às

subunidades beta das tubulinas, resultando na formação de microtúbulos estáveis e não funcionais, aprisionando as células na fase G2/M (JIANG *et al.*, 2006).

Antibióticos também são utilizados no tratamento antineoplásico. Como exemplo, a doxorubicina (DOX) e a daunorrubicina são antraciclinas isoladas a partir do pigmento produzido por *Streptomyces peucetius* (MINOTTI *et al.*, 2004), e interferem na ação de enzimas envolvidas na replicação do DNA, agindo em todas as fases do ciclo celular.

DOX é um dos antineoplásicos prescritos mais potentes, exibindo um amplo espectro de ação tanto contra tumores hematopoiéticos quanto contra tumores sólidos. Estudos têm atribuído a ação antitumoral da DOX à sua capacidade de se intercalar no DNA ou se ligar covalentemente às proteínas envolvidas na replicação e transcrição (BOX, 2007). Assim, essa interação resulta em inibição do DNA, RNA e síntese de proteínas, causando morte celular. Apesar de a DOX apresentar ação contra vários tipos de neoplasias, sua toxicidade limita o sucesso do tratamento (CARVALHO *et al.*, 2009; OCTAVIA *et al.*, 2012).

Além dos fármacos já utilizados, produtos naturais têm sido estudados como adjuvantes, de forma sinérgica, com agentes antitumorais, aumentando a sensibilidade de células tumorais (EID *et al.*, 2012). O uso de plantas medicinais e metabólitos microbianos tem ampliado a expectativa de vida, seja empiricamente ou a partir da síntese de medicamentos de origem natural (DEMAIN & VAISHNAV, 2011). A ação antineoplásica de produtos naturais tem sido intensamente investigada e dos 140 agentes antitumorais, disponíveis desde a década de 40, mais de 60% são oriundos de compostos naturais (AMBROZ *et al.*, 2016). Os mecanismos de ação desses agentes incluem indução de apoptose, clivagem do DNA mediada pela inibição pela topoisomerase I ou II, permeabilização mitocondrial, inibição de enzimas envolvidas na transdução de sinal ou no metabolismo celular, e por inibição da angiogênese (DEMAIN & VAISHNAV, 2011).

Os tratamentos antineoplásicos são associados não somente à sua toxicidade, mas também aos efeitos colaterais clássicos como náuseas, vômitos e alopecia, além de outros efeitos mais graves como esteatose hepática, pseudocirrose, pancreatite, esclerose biliar, dentre outros (ALBINI *et al.*, 2010; KUCZYNSKI *et al.*, 2013; BROWN *et al.*, 2015; NGO *et al.*, 2015; SHANKAR *et al.*, 2015). Ademais, a quimioterapia pode induzir resistência em células tumorais.

O termo “resistência a drogas” em relação aos tratamentos de tumores é relacionado com “progressão da doença”. Uma vez que o paciente desenvolve resistência adquirida a um determinado fármaco, outra estratégia terapêutica deve ser adotada (KUCZYNSKI *et al.*, 2013). A resistência de células tumorais é um fenômeno complexo que envolve múltiplas

proteínas, porém as mais estudadas estão relacionadas a um único fenótipo, a resistência a múltiplas drogas (MDR) (HOLOHAN *et al.*, 2013). Este fenótipo MDR foi descoberto na década de 70, estando relacionado à expressão elevada de uma proteína denominada glicoproteína-P (P-gp). Além da P-gp, também estão envolvidas com o MDR a proteína associada ao MDR 1 (também conhecida como MRP1 ou ABC1) e BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*). Tais proteínas têm como principal função promover a eliminação de vários compostos hidrofóbicos, incluindo a maioria dos quimioterápicos, assim como taxanos, inibidores da topoisomerase e antimetabólitos. Estudos têm relatado a eficácia da quimioterapia combinada com inibidores da P-gp na reversão do quadro de resistência (MILROY, 1993; SCHUURHUIS *et al.*, 1993).

Além da resistência às drogas e dentre os efeitos colaterais do tratamento quimioterápico, a imunossupressão tem sido fortemente apontada como preocupante. O desequilíbrio do sistema imune pode acarretar algumas complicações, sendo uma delas o aparecimento de infecções oportunistas. Como exemplo a *Candida albicans*, que apesar de ser um fungo da microbiota humana, pode se tornar patogênico, levando à óbito mais de 30% dos indivíduos imunocomprometidos. Uma das alternativas nestes casos é o uso da imunoterapia associada ao tratamento quimioterápico (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004, NETEA *et al.*, 2008). Além de fungos causadores de infecções em pacientes oncológicos, Baden e colaboradores (2012) realizaram um estudo com portadores de leucemia, analisando dados obtidos ao longo de 18 anos, e concluíram que *Escherichia coli* foi a maior responsável por infecções severas durante o tratamento. Bactérias Gram-positivas vêm sendo associadas a cerca de 50% dos casos de infecções em pacientes com câncer. Dentre as Gram-positivas, o *Staphylococcus aureus* possui um grande impacto no meio clínico, cerca de 10% dos casos de infecção são associados a esta bactéria, além de ser responsável por 1/3 das infecções de pele e pneumonia em indivíduos portadores de tumor (HOLLAND *et al.*, 2014). Além das infecções por *Staphylococcus aureus*, existe o risco aumentado para infecções orais sendo causadas por *Streptococcus mutans*, que podem levar a piora do quadro clínico dos pacientes oncológicos e até mesmo um quadro de sepsi sem razões aparentes (MOSEL *et al.*, 2011). Hong e colaboradores (2010) avaliaram, em sua revisão, 64 trabalhos publicados entre 1990 e 2008 sobre a saúde oral de pacientes oncológicos que estavam passando por quimioterapia ou radioterapia. Os pesquisadores concluíram que a prevalência de caries aumentava após o tratamento antineoplásico de forma significativa, foi demonstrado também que o tratamento oral prévio ao início da quimio/radioterapia diminuía a incidência de infecções orais as quais poderia ser um risco a saúde dos pacientes imunossuprimidos.

Com o intuito de atenuar os efeitos colaterais causados pelos agentes antitumorais, a administração de produtos naturais concomitantemente com fármacos tem sido investigada, a fim de obter uma interação entre ambos por efeito sinérgico ou antagônico (AMBROZ *et al.*, 2016; SURMELI *et al.*, 2015). CARLSON *et al.* (2014) demonstraram que o resveratrol combinado com curcumina potencializou o efeito inibitório da DOX sobre células de câncer de ovário, atenuando seus efeitos tóxicos sobre cardiomiócitos. Em outro estudo, a curcumina acarretou melhora no efeito supressor da cisplatina sobre células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço, por inibir a via do NF- κ B e da proteína IKK β (DUARTE *et al.*, 2010).

Além de plantas medicinais e metabólitos microbianos, há também os chamados “opoterápicos”, obtidos a partir de glândulas, órgãos, tecidos ou secreções animais. Um exemplo de opoterápico é a própolis produzida por abelhas africanizadas, a qual é um produto de características físicas resinosas e composição variável, coletada a partir de várias espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha.

A própolis tem sido intensamente investigada por nosso grupo de pesquisa, avaliando principalmente sua ação imunomoduladora, antitumoral e antimicrobiana (SFORCIN, 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2011; SFORCIN, 2016). A própolis vem sendo apontada como agente citotóxico, antitumoral e quimiopreventivo contra vários tipos de tumores (BANSKOTA *et al.*, 2001; ORŠOLIĆ *et al.*, 2010; WATANABE *et al.*, 2011; FRIÓN-HERRERA *et al.*, 2015). Alguns estudos indicam seu potencial em melhorar a ação de drogas antitumorais, através de um possível efeito sinérgico (ORŠOLIĆ *et al.*, 2013; MARKIEWICZ-ZUKOWSKA *et al.*, 2013).

Diferentemente da própolis produzida por abelhas africanizadas, a geoprópolis é produzida por abelhas sem ferrão (meliponíneos) a partir da mistura de resina, fibras vegetais, cera e, tipicamente, terra ou barro. Nas colmeias, a geoprópolis é utilizada amplamente, servindo como base para construção de estruturas externas (tubos e entrada) e internas (favos de cria, lamelas de invólucro e potes de alimento) (NOGUEIRA-NETO, 1997). De modo geral, as amostras de geoprópolis apresentam-se como fragmentos rígidos e com diferentes tamanhos, com grânulos inodoros e de consistência heterogênea, coloração marrom escura e sabor amargo. O método de preparo dos extratos de geoprópolis pode influenciar em sua atividade, uma vez que os diferentes solventes solubilizam e extraem compostos diferentes.

Geoprópolis tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de doenças respiratórias e dermatoses. Em estudos anteriores, a geoprópolis apresentou propriedade antioxidante (DUTRA *et al.*, 2014) e moduladora do perfil de citocinas em camundongos (LIBERIO *et al.*, 2011), além de efeito antiproliferativo sobre linhagens tumorais humanas

(CUNHA *et al.*, 2013). Nosso grupo tem investigado as ações farmacológicas da geoprópolis, demonstrando ação antimicrobiana, imunomoduladora e citotóxica sobre células HEP-2 (ARAÚJO *et al.*, 2015). Também foi verificada sua ação como agente citotóxico contra células de osteossarcoma canino (CINEGAGLIA *et al.*, 2013)

Dando continuidade a estas investigações, uma pesquisadora do grupo (Ariane Rocha Bartolomeu) avaliou a ação da geoprópolis, em concentrações não citotóxicas, associada a diferentes quimioterápicos contra células HEP-2, analisando o efeito antiproliferativo e citotóxico, indução de apoptose e morfologia celular, e inibição sobre a P-gp. Os dados obtidos quanto à combinação geoprópolis + doxorubicina foram promissores, apresentando aproximadamente 60% de citotoxicidade sobre células tumorais em comparação a estas variáveis isoladamente, as quais praticamente não afetaram a viabilidade celular (BARTOLOMEU *et al.*, 2016).

Os danos advindos da quimioterapia não se restringem às células tumorais e um dos grandes fatores implicados na toxicidade dos agentes antitumorais é a falta de seletividade entre células normais e tumorais, o que também pode comprometer o sistema imunológico (MACKALL *et al.*, 1994; ONYEMA *et al.*, 2015). A diminuição de células B, células T, monócitos e neutrófilos também pode ser observada após tratamento com quimioterápicos e, apesar de haver uma taxa de recuperação destas células, com o tempo esta taxa diminui, culminando em concentrações menores de leucócitos circulantes (MACKALL *et al.*, 1994).

No intuito de aprofundar os estudos da associação geoprópolis + DOX, a qual exerceu eficiente ação contra células HEP-2, e observar seu efeito na imunidade, avaliamos a ação desta combinação sobre células THP-1, com a finalidade de evidenciar sua possível ação imunomoduladora. Os dados obtidos revelaram que a geoprópolis exerceu um perfil pró-inflamatório, estimulando a expressão de TLR-4 e CD80 e a produção de TNF- α . Além disso, a combinação de geoprópolis com doxorubicina impediu o efeito inibitório desencadeado pela doxorubicina isoladamente na expressão de TLR-4 (OLIVEIRA *et al.*, 2016), o que nos incitou a dar continuidade às pesquisas nesta linha de associação de produtos naturais com quimioterápicos. Células THP-1 têm sido utilizadas como modelo no estudo de doenças cardiovasculares (QIN, 2012), para testes dermatológicos de novos cosméticos (GARCIA *et al.*, 2013), e até mesmo para analisar o efeito de produtos de origem vegetal na resposta imune (CHANPUT *et al.*, 2010). Embora o uso das células THP-1 minimize a variabilidade genética, o estudo com monócitos de indivíduos saudáveis permite uma abordagem mais ampla quanto à investigação da ação imunotoxicológica e imunomoduladora da geoprópolis associada à doxorubicina, apresentando implicações práticas importantes.

Assim, dando sequência a esta linha de pesquisa, ampliamos as investigações, analisando o efeito da combinação geoprópolis + doxorrubicina sobre monócitos humanos quanto ao seu possível efeito citotóxico e imunomodulador, através da avaliação da expressão de marcadores de superfície celular e vias de sinalização, a produção de citocinas e de peróxido de hidrogênio, e a atividade microbicida destas células.

2. JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Diante da imunossupressão e da maior suscetibilidade a infecções oportunistas causadas pelos tratamentos quimioterápicos existentes, surgiu o interesse em estudar o efeito citotóxico e imunomodulador da combinação entre geoprópolis e doxorrubicina em monócitos humanos. Considerando que esta combinação apresentou efeito citotóxico sobre células tumorais (HEp-2), a adoção da mesma na terapêutica pode ser relevante, diminuindo a concentração do quimioterápico para evitar efeitos colaterais, sem afetar as funções imunológicas, o que pode ser de interesse para a indústria farmacêutica futuramente.

Os monócitos são células do sistema fagocítico mononuclear com fundamental importância na imunidade inata do hospedeiro, sendo um modelo bem estabelecido na literatura para a avaliação das funções imunológicas *in vitro*. Ademais, a administração sistêmica de quimioterápicos pode afetar a função de monócitos, que são células circulantes do sangue periférico.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o possível efeito citotóxico e imunomodulador da combinação geoprópolis + doxorrubicina sobre monócitos humanos, através da avaliação da expressão de marcadores de superfície celular e vias de sinalização, a produção de citocinas e de peróxido de hidrogênio, e a atividade microbicida destas células.

Objetivos específicos:

- Verificar o possível efeito citotóxico da geoprópolis associada à doxorubicina sobre monócitos de indivíduos saudáveis;
- Analisar a expressão de marcadores de superfície celular (TLR-2, TLR-4, HLA DR, CD40, CD80) em monócitos, por citometria de fluxo;
- Avaliar a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Avaliar a expressão gênica de LC3A/B e NF- κ B por RT-qPCR;
- Avaliar a quantidade de phospho-I κ B α por Western blot;
- Avaliar a capacidade microbicida de monócitos após tratamento com geoprópolis associada à doxorubicina;
- Avaliar a produção de peróxido de hidrogênio por monócitos humanos após tratamento com as variáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CAAE 6827 1617.8.0000.5411).

4.1. Obtenção das amostras de geoprópolis

A geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* Smith foi fornecida pelo apicultor Sr. Manuel Barros, a partir de colmeias localizadas no município de Palmeirândia (2° 39' S, 44° 55' O), pertencente à microrregião da baixada ocidental maranhense. A amostra foi coletada de forma asséptica, com auxílio de espátulas esterilizadas, e mantida a -20°C. A amostra foi analisada quimicamente por técnicas cromatográficas, revelando que seus principais compostos são lupeol, amirinas, ácido anacárdico, dentre outros (ARAÚJO *et al.*, 2015).

4.2. Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e da solução de doxorubicina.

A amostra de geoprópolis (30 g) foi triturada, macerada e extraída em 100 mL de etanol 70%, a temperatura ambiente e sob moderada agitação. Após 24 h, o material foi

filtrado e a concentração final foi calculada, obtendo-se o peso seco do extrato hidroalcoólico de geoprópolis (9,6 mg/mL). O extrato final de geoprópolis foi utilizado na concentração de 25 µg/mL e diluído em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) completo, suplementado com soro fetal bovino (10%) e 1% de penicilina/estreptomicina.

A doxorrubicina foi adquirida em uma farmácia de manipulação local (Botucatu, SP), e diluída em meio RPMI 1640 completo para se obter a concentração de 1 µM. A concentração de DOX foi estabelecida de acordo com ensaios anteriores padronizados em nosso laboratório (BARTOLOMEU *et al.*, 2016). As concentrações de 25 µg/mL e 1 µM foram utilizadas para preparar a combinação G + D, respectivamente.

4.3. Obtenção de monócitos humanos

O sangue foi obtido de 10 indivíduos voluntários saudáveis, que assinaram um termo de consentimento para doação de sangue (Anexo 1) dando ciência desta pesquisa. Foram aceitos indivíduos acima de 18 anos, não fumantes e que não estivessem utilizando medicação de espécie alguma. Tais indivíduos foram informados desta pesquisa através de cartazes afixados nos murais do Instituto de Biociências, e participaram desta pesquisa somente aqueles que tiveram interesse por livre e espontânea vontade.

Amostras de sangue (20 mL) foram coletadas e colocadas em tubos estéreis contendo 200 µL de heparina. Posteriormente, os monócitos foram obtidos por separação em gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, UK), 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 meio RPMI completo. A identificação de monócitos viáveis e contagem foram realizadas através da incorporação de vermelho neutro 0,02% durante 8 minutos a 37 °C, e ajustados para 1 x 10⁶ monócitos/mL para a realização dos experimentos.

4.4. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT (3(4,5dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – Sigma-Aldrich, EUA). O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a formazan. Após incubação das culturas celulares com os diferentes estímulos por 18 h, o sobrenadante foi removido, e foram adicionados 300 µL de MTT (1 mg/mL)

dissolvido em meio RPMI completo, seguido de posterior incubação a 37 °C em 5% de CO₂ por 3 h. Após este período, o MTT foi retirado e foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade ótica (D.O.) em leitor de ELISA com filtro de 540 nm, e calculadas as porcentagens de viabilidade celular. Os resultados foram expressos em relação ao controle, considerado como 100%.

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

Nos ensaios de citometria de fluxo, utilizamos o citômetro de fluxo modelo FACS Calibur™ (BD Becton Dickinson and Company, EUA) para avaliação da presença dos seguintes marcadores celulares: TLR-2, TLR-4, CD80, CD40 e HLA-DR. As células (1 x 10⁶ monócitos/mL) foram colocadas em tubos para citômetro (500 µL) e centrifugadas por 10 minutos a 465 x g. O sobrenadante foi descartado e as culturas incubadas por 18 h, a 37 °C e 5% de CO₂, com a geoprópolis simultaneamente ou não com o fármaco. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspendidas 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 estimuladas foram incubadas com anticorpos anti-TLR-2 conjugado com FITC (clone TL2.1 – Biolegend, EUA) e anti-TLR-4 conjugado com PE (clone HTA125 – Biolegend, EUA). No grupo B, os monócitos foram incubados com anticorpos anti-HLA-DR conjugado com FITC (clone L243 – Biolegend, EUA), anti-CD80 conjugado com PE (clone D210 – Biolegend, EUA) e anti-CD40 conjugado com APC (clone 5C3 – Biolegend, EUA). As células foram marcadas com anti-CD14 conjugado com PerCP/Cy5.5 (clone HCD14 – Biolegend, EUA), o que permitiu a seleção do gate para apenas células CD14+. Foi incluído um tubo controle onde as células foram incubadas com anticorpos de controle isotópico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes (PE, FITC, PerCP/Cy5.5 e APC – Biolegend, EUA) durante 30 minutos ao abrigo da luz a 4 °C. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 465 x g para lavagem e fixadas em 500 µL de ISOTON II contendo 5% de paraformaldeído. As análises foram realizadas utilizando o software CellQuest e foi padronizada a aquisição de 30.000 eventos. Os resultados foram expressos em percentual de células CD14+ positivas.

4.6. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA

A determinação da concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Inicialmente foram adicionados 100 μ L de salina tamponada com fosfato (PBS) e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R & D Systems, EUA) às placas (Maxisorp Nunc, EUA), e incubadas overnight a 4 °C em câmara úmida. Após 3 lavagens dos poços com PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), ocorreu o bloqueio dos poços com 300 μ L de albumina sérica bovina (10%) (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS para saturação dos sítios de ligação e, em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 h. A seguir, nova sequência de lavagens foi realizada e foram adicionadas alíquotas de 100 μ L dos sobrenadantes das culturas celulares incubadas com os tratamentos, na presença ou ausência de lipopolissacarídeo (LPS 10 μ g/mL – Sigma-Aldrich, EUA) com posterior incubação por 2 h a temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram novamente lavados e, foi adicionado 100 μ L de anticorpo de detecção policlonal e novamente foi realizada incubação por 2 h a temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 100 μ L do conjugado estreptoavidina-peroxidase, incubando-se por 20 minutos ao abrigo de luz. Novas lavagens foram realizadas e, para revelação, foram adicionados 100 μ L da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB). Após 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ a 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 490 nm.

4.7. Extração de RNA

O RNA total foi extraído pelo método baseado em TRIzol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, EUA). Posteriormente, a integridade e a concentração de RNA foram medidas espectrofotometricamente, utilizando o leitor de microplaca Multi-Mode HTX com acessórios para placas Take-Trio Micro-Volume (BioTek, EUA).

4.8. Expressão gênica

A reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando um sistema de PCR em tempo real QuantStudio® 3 para avaliar as alterações na expressão do mRNA nos genes mencionados na Tabela 1. O RNA total foi extraído das células com Reagente Ambion TRIzol (Life Sciences – Fisher Scientific Inc, EUA) e tratados com DNase

I (Invitrogen, EUA). A síntese de cDNA foi realizada com Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O qPCR foi realizado em um total de 10 μ l, contendo PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x (5 μ l) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,4 μ M de cada iniciador, 100 ng de cDNA e H₂O livre de nuclease. As expressões relativas foram analisadas pelo método CT comparativo ($\Delta\Delta$ Ct), normalizados pela expressão de β -actina e comparando as condições estáticas como referência.

Tabela 1. Sequência dos *primers* e condições da PCR.

Gene (ID)	Primer	5'- 3' Sequência	Condições de reação
NFkB (4790)	Forward	CACCTGTTCCAAAGAGCACC	95°C - 15s; 67°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	GGTTCAGGAGCTGCTGAAAC	
LC3 (84557)	Forward	CTTCTGAGCCAGCAGTAGGG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	GAGGGACAACCCTAACACGA	
Actin (60)	Forward	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	GCGGCGATATCATCATCC	

4.9. Western blot

Após 18 h de tratamento, os monócitos foram lavados com PBS pH = 7,4 e lisados durante 1 h em gelo com tampão RIPA suplementado com inibidores de protease (Sigma Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após quantificação da concentração de proteína pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA), uma quantidade de proteína (75 μ g) foi separada por SDS-PAGE e transferida para membrana de PVDF (Millipore, EUA). Após bloqueio com 1% de leite seco desnatado em solução salina tamponada com Tris (TBS) e 0,05% de Tween 20 (TBST), a membrana foi exposta *overnight* a 4° C aos anticorpos primários para fosfo-I κ B α (1/1000) e β -actina (1/1000) (Cell Signalling, EUA) como controle de proteína. A revelação foi realizada incubando a membrana durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário *anti-mouse* (1/5000) conjugado com peroxidase, para posterior detecção (Abcam, EUA). As intensidades de banda foram posteriormente quantificadas usando o software ImageJ.

4.10. Atividade microbiana de monócitos

Para esta avaliação, foram utilizadas as cepas de *Candida albicans* (SC 5314), de *Escherichia coli* (ATCC 43895) e de *Streptococcus mutans* (CCT 3440), as quais foram semeadas em meio BHI (Oxoid, EUA) a 35 °C por aproximadamente uma semana. Após este período, a contagem de fungos foi padronizada pela contagem em câmara de Neubauer, em corante azul de tripan contendo aproximadamente 1×10^6 UFC/mL, e a contagem de bactérias foi padronizada na escala 0,5 de Macfarland. Após padronizações, verificamos que a melhor proporção foi de 1 monócito : 5 fungos/ bactérias, a qual foi adotada por apresentar atividade microbiana na faixa de 15 a 30% – faixa esta classificada como uma boa atividade, pois assim pode-se verificar a ação estimuladora ou inibitória dos tratamentos sobre as células estudadas a partir desta porcentagem, conforme observado em trabalhos anteriores de nosso grupo (MURAD *et al.*, 2002; ORSI *et al.*, 2005).

Os monócitos foram obtidos como descrito anteriormente, distribuídos em placas de microcultura (1×10^6 células/mL) contendo meio RPMI completo, e estimulados com as variáveis, por 18 h a 37 °C. Após este período, o sobrenadante foi removido e as células desafiadas com os micro-organismos, na proporção supracitada, a 37 °C e 5% de CO₂ por 2 h. Como controle, foi plaqueada somente a cepa de *C. albicans*, *E. coli* ou *S. mutans* e, como atividade microbiana basal, os monócitos foram incubados somente com meio de cultura e desafiados com as cepas. Após o período de desafio, os sobrenadantes foram coletados, e foram realizadas diversas lavagens com água destilada gelada. Este processo permitiu a remoção dos monócitos da placa, sua lise e consequente liberação dos micro-organismos que foram eventualmente fagocitados. Este material foi adicionado ao sobrenadante já coletado. O volume total obtido com a remoção do sobrenadante e as lavagens foi de 10 mL. Destes, 20 µL foram plaqueados em meio Sabouraud Dextrose (Oxoid, EUA), para o crescimento das colônias de *C. albicans*, e em meio BHI para o crescimento das culturas de *E. coli* e *S. mutans*. Após 24 h, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) dos micro-organismos foi determinado e a porcentagem (%) da atividade microbiana calculada através da seguinte fórmula:

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

4.11. Produção de peróxido de hidrogênio

A diclorofluoresceína (DCF) foi utilizada como indicador da formação intracelular de espécies reativas de oxigênio. A diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) atravessa a membrana celular e, no interior, é esterificada pelas esterases intracelulares e susceptível à oxidação pelo peróxido de hidrogênio, levando a formação da DCF, que é a forma fluorescente.

Monócitos humanos foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células/mL e tratados com meio RPMI completo (controle), GEO, DOX e sua associação. Após 18 h de incubação, para o controle positivo foi adicionado 5,3 mM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 15 minutos. As células foram colhidas, centrifugadas e lavadas com PBS. O DCF-DA (5 μ M) foi adicionado por 45 minutos, posteriormente as células foram lavadas novamente com PBS e centrifugadas, o sobrenadante foi eliminado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em isotôn. As células foram analisadas em comprimento de onda de 480 nm de excitação e a emissão de fluorescência foi medida no canal FL-1 a 530 nm, utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Becton Dickinson and Company, EUA), e 40.000 eventos foram registrados para cada análise.

4.12. Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada através do software GraphPad Prism 5 (GraphPad, USA), utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Viabilidade celular

As concentrações de geoprópolis utilizadas no presente estudo se baseiam nos resultados encontrados por uma pesquisadora do nosso grupo, que verificou a possível ação citotóxica da geoprópolis em associação com drogas antitumorais convencionais (carboplatina, metotrexato e doxorubicina) sobre células HEP-2. A associação entre geoprópolis (25 µg/mL) e doxorubicina (1 µM) se mostrou a mais eficiente contra as células tumorais em comparação à geoprópolis combinada com carboplatina ou metotrexato (BARTOLOMEU *et al.*, 2016) e, sendo assim, utilizamos tais resultados como parâmetro inicial para analisar os efeitos desta associação sobre células do sistema imune. Os monócitos são células do sistema fagocítico mononuclear com fundamental importância na imunidade inata do hospedeiro, sendo também um modelo bem estabelecido na literatura para a avaliação das funções imunológicas *in vitro*. Ademais, a administração sistêmica de quimioterápicos pode afetar a função de monócitos, que são células circulantes do sangue periférico.

Inicialmente, analisamos a viabilidade de monócitos humanos pelo método da redução do MTT, após incubação com a geoprópolis (G) e doxorubicina (D) isoladamente, e em associação (G + D), tanto na ausência quanto na presença de LPS após 18 h. Conforme observado na figura 1, nenhum dos tratamentos apresentou citotoxicidade sobre os monócitos, tendo a viabilidade se mantido $\geq 90\%$.

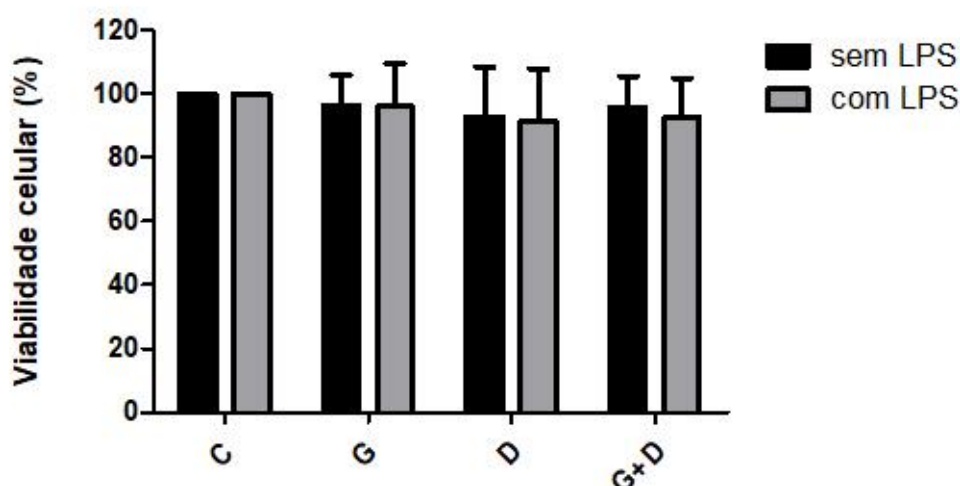


Figura 1. Viabilidade (%) de monócitos humanos incubados com meio RPMI 1640 (controle – C), geoprópolis (G – 25 µg/mL), doxorubicina (D – 1 µM) e associação (G + D) após 18 h, na ausência ou presença de LPS (10 µg/mL). Os dados representam media e desvio padrão (n=10).

A ausência de ação citotóxica da geoprópolis sobre células normais como monócitos e células dendríticas, bem como sobre células Vero e células THP-1, está de acordo com trabalhos anteriores do grupo utilizando geoprópolis, própolis ou compostos isolados (SFORCIN *et al.*, 2002; CONTI *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2015; BARTOLOMEU *et al.*, 2016; CONTI *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2016). Santos e colaboradores (2017) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de geoprópolis, nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, protegeu eritrócitos da lise oxidativa, evidenciando assim a ação citoprotetora da geoprópolis frente ao estresse oxidativo. Ademais, a associação de um produto natural com quimioterápico está se revelando ser uma boa abordagem contra células tumorais.

5.2. Expressão de marcadores de superfície celular

Após incubação com os estímulos e retirada do sobrenadante, as células foram submetidas ao protocolo de marcação com anticorpos monoclonais fluoresceinados para a análise da expressão de marcadores de superfície, por citometria de fluxo. O tratamento de monócitos com geoprópolis e com a associação acarretou aumento significativo na expressão de TLR-4, enquanto a expressão de CD80 foi alterada somente pela associação. A expressão de TLR-2, CD40 e HLA-DR não foi alterada pelos tratamentos, quando comparada ao controle (figura 2).

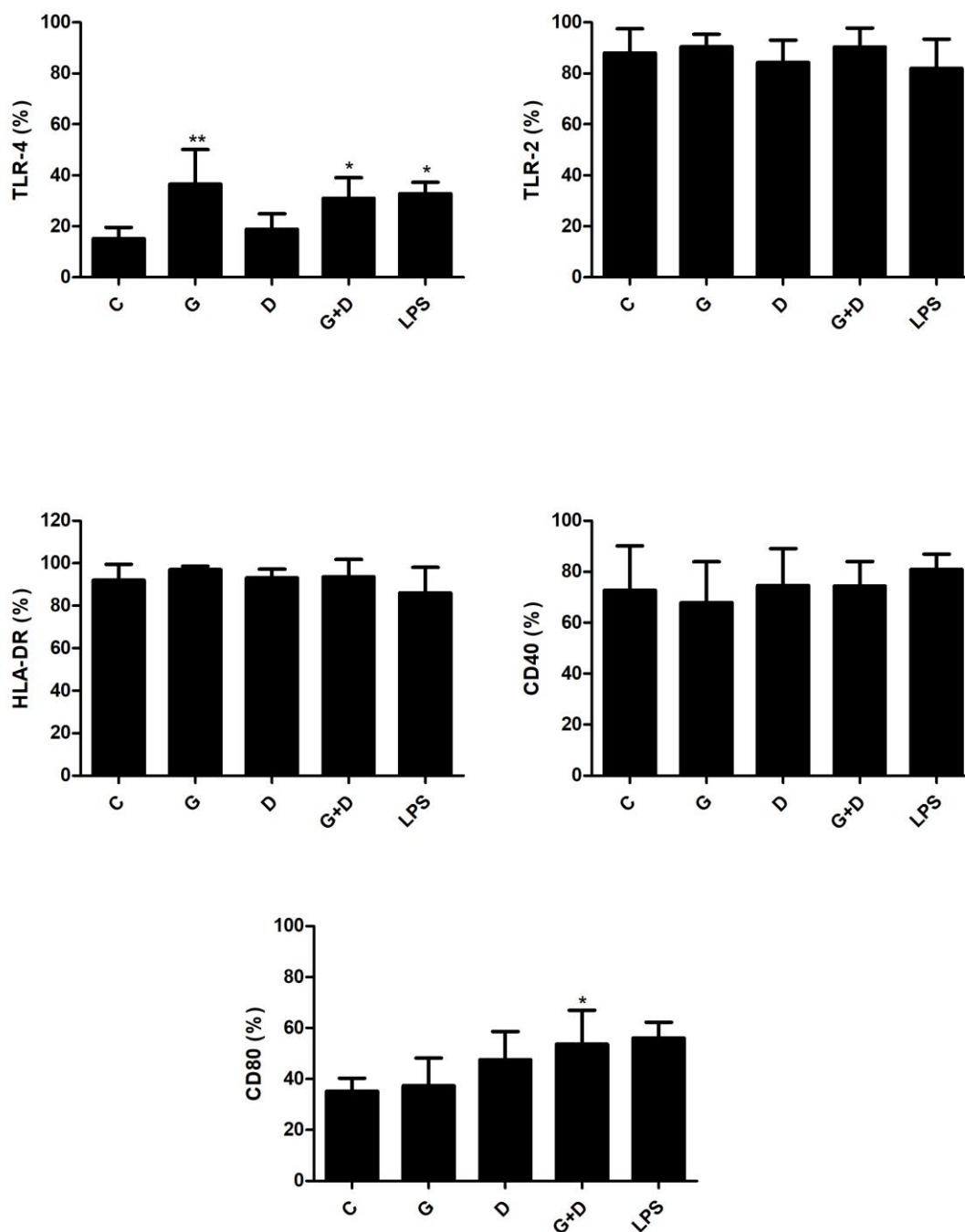


Figura 2. Porcentagem (%) de monócitos humanos que expressam TLR-4, TLR-2, CD80, CD40 e HLA-DR após incubação somente com meio RPMI 1640 (controle – C), geoprópolis (G – 25 µg/mL), doxorubicina (D – 1 µM) ou associação (G + D) por 18 h. Os dados representam média e desvio-padrão (n=10). Significativamente diferente do controle: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$).

A expressão de receptores é de suma importância para a ativação da resposta imune frente a patógenos. Dentre eles, podemos destacar o TLR-4, que possui como agonista principal o LPS de bactérias Gram-negativas, sendo assim um importante marcador de

superfície para o combate às infecções mais comuns, como causadas por *E. coli* (TAKEDA & AKIRA, 2005; BADEN *et al.*, 2012). Portanto, o aumento da expressão de TLR-4 pela associação é interessante, principalmente em indivíduos em que o sistema imune está comprometido por tratamentos agressivos, como a quimioterapia.

Em relação ao TLR-2 sua alta expressão, como observada em nossos resultados, é importante não somente para imunidade inata como também para a resposta imune adaptativa. Como exemplo, Fricke e colaboradores (2006) demonstraram que este receptor foi a principal via pela qual células dendríticas (DCs) interagiram com *Mycobacteria* spp, levando à produção de IFN- γ e consequente ativação da imunidade celular.

Outro marcador de suma importância é o CD40, sendo expresso em APCs durante sua interação com linfócitos T. Já foi demonstrado que a interação CD40/CD40L promove a produção de citocinas, expressão de moléculas co-estimulatórias em células do sistema imune e resposta citotóxica frente a células infectadas por vírus ou células tumorais. Falhas na regulação desta via de sinalização estão associadas também ao desenvolvimento de doenças autoimunes dependentes de linfócitos T citotóxicos. Outra ação do CD40, por meio dos TRAFs (fatores associados a receptores TNF), é a ativação de diferentes vias intracelulares associadas à inflamação como a via do NF- κ B, das proteínas quinases dependentes de mitógenos (MAPKs), da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e da fosfolipase C γ (PLC γ). (ELGUETA *et al.*, 2009). A associação não alterou a expressão deste marcador, não prejudicando sua atividade.

Em relação à expressão de HLA-DR, nosso grupo obteve resultados semelhantes utilizando monócitos humanos e células dendríticas tratadas com própolis, não havendo alteração na expressão deste marcador, mantendo assim a possível integridade na capacidade apresentadora de antígeno destas células (BÚFALO *et al.*, 2014; CONTI *et al.*, 2016). A redução da expressão de HLA-DR pode estar associada ao aumento de cortisol durante situações estressantes para o organismo, como cirurgias complexas e infecções sistêmicas, o que pode comprometer a resposta imune do indivíduo (KIM *et al.*, 2010). Ademais, sua diminuição pode estar relacionada ao desenvolvimento do linfoma não-Hodgkin. Pesquisadores avaliaram a expressão deste marcador em biópsias de pacientes com este linfoma, demonstrando que a diminuição da expressão em alguns pacientes está associada a menor sobrevida, mesmo com tratamento quimioterápico. Os pesquisadores notaram ainda menor ação citotóxica de células CD8⁺ sobre as células tumorais e perda da capacidade de apresentação antigênica de APCs (HIGASHI *et al.*, 2015).

Outro marcador avaliado no presente trabalho foi o CD80. Bueno-Silva e colaboradores (2015) ao analisar macrófagos murinos incubados com extrato alcoólico de própolis vermelha e LPS, observaram o aumento da expressão de CD80 quando comparada ao controle, semelhante aos nossos resultados. Neste mesmo trabalho, os autores observaram também o aumento da produção de TNF- α pelo tratamento, revelando assim a ação moduladora da própolis vermelha e sugerindo sua utilização como suplemento alimentar bioativo. Por outro lado, Byun (2014) observou menor expressão de CD80 e CD86, e menor produção de citocinas próinflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), na presença de LPS, ao estudar macrófagos murinos incubados com o extrato de *Schizonepeta tenuifolia*, uma erva utilizada popularmente para o tratamento de resfriado comum, evidenciando assim o caráter imunomodulador/anti-inflamatório desta planta.

Conforme observado, diferentes produtos naturais podem apresentar ações biológicas distintas, dependendo da composição química da amostra. Especialmente em se tratando de própolis e geoprópolis, há inúmeras amostras encontradas nos diversos continentes, apresentando constituição química dependente das fontes botânicas disponíveis no local. Isto se tornou um desafio a ser vencido para a padronização de ensaios, e a maneira adotada para tal seria sempre realizar a análise química do extrato, para que sua composição fique acessível à comunidade científica, associado ao conhecimento das fontes vegetais e propriedades biológicas apresentadas por uma dada amostra (SFORCIN & BANKOVA, 2011). Vale ressaltar que nossa amostra de geoprópolis foi analisada quimicamente por métodos cromatográficos, sendo seus principais componentes lupeol, amirinas, ácido anacárdico dentre outros (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Os resultados ora apresentados estão de acordo com o trabalho anterior do grupo (OLIVEIRA *et al.*, 2016) no qual a geoprópolis em associação com doxorubicina induziu aumento significativo na expressão de TLR-4 e CD80 sem afetar a expressão de outros marcadores importantes para apresentação antigênica, reconhecimento de patógenos e coestimulação.

5.3. Produção de citocinas

Os monócitos foram incubados com os tratamentos durante 18 h na presença ou ausência de LPS. A produção de TNF- α e IL-10 não foi detectada quando as células foram incubadas na ausência de LPS.

Com relação à produção de TNF- α , a geoprópolis e a doxorubicina induziram aumento na produção desta citocina. Interessantemente, a associação induziu maior aumento de TNF- α em relação às variáveis isoladamente. Quanto à produção de IL-10, a geoprópolis e a doxorubicina aumentaram significativamente sua produção, porém a associação não induziu alterações quando comparada ao LPS (figura 3).

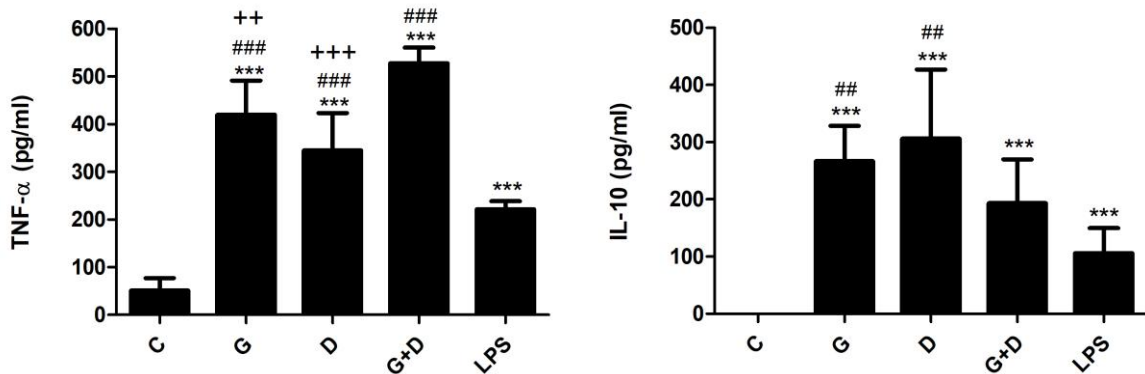


Figura 3. Produção de TNF- α e IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos incubados com meio RPMI 1640 (controle – C), com geoprópolis (G – 25 μ g/mL), doxorubicina (D – 1 μ M) e associação (G + D) após 18 h na presença de LPS (10 μ g/mL). Significativamente diferente do controle: *** ($P < 0.001$). Significativamente diferente do LPS: ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$). Significativamente diferente da associação: ++ ($P < 0.01$), +++ ($P < 0.001$).

Na ausência de LPS, a produção de IL-1 β foi levemente inibida pela GEO e estimulada pela DOX, enquanto a associação manteve sua produção nos níveis basais (figura 4A). As células incubadas com os tratamentos na presença de LPS não demonstraram qualquer alteração na produção desta citocina em relação ao LPS (figura 4B).

A produção de IL-6, tanto na presença quanto na ausência de LPS, foi inibida por todos os tratamentos quando comparada ao LPS e ao controle (figuras 4C e 4D).

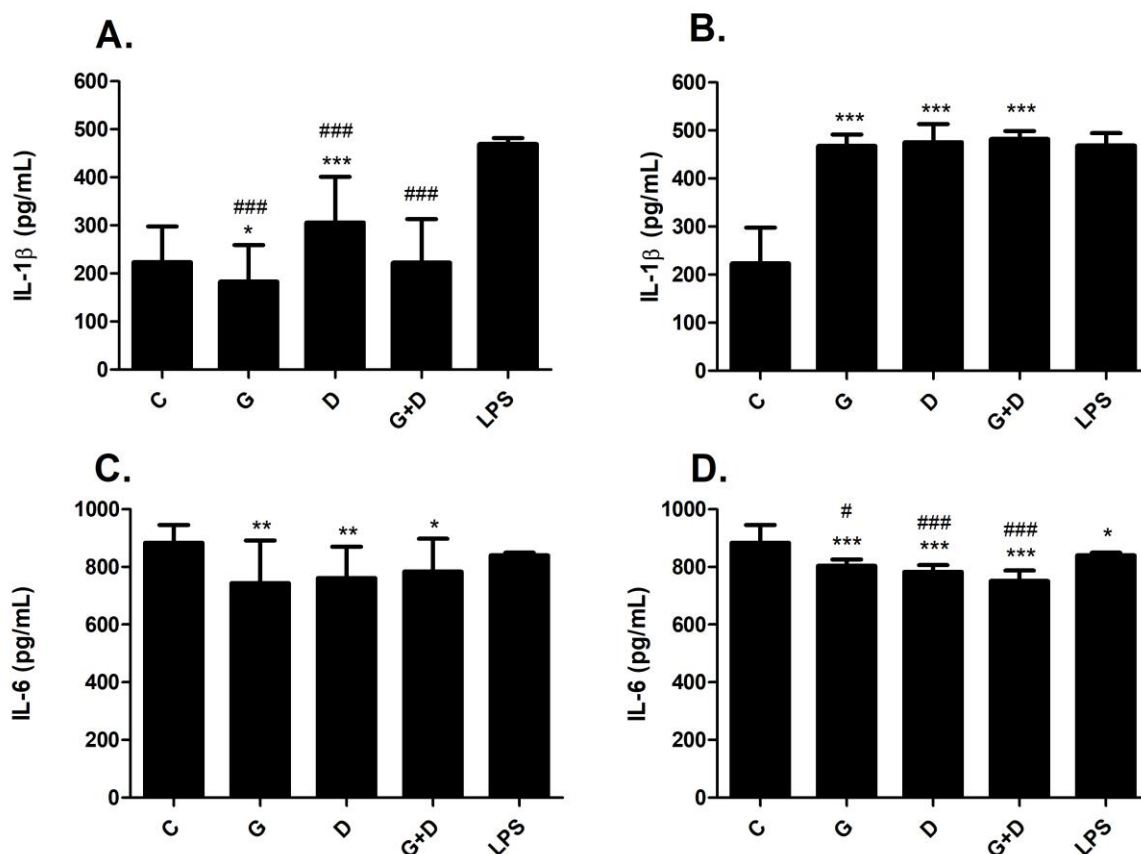


Figura 4. Produção de IL-1 β e IL-6 (pg/mL) por monócitos humanos incubados com meio RPMI 1640 (controle – C), com geoprópolis (G – 25 μ g/mL), doxorrubicina (D – 1 μ M) e associação (G + D) após 18 h na ausência (A e C) ou presença (B e D) de LPS (10 μ g/mL). Significativamente diferente do controle: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), *** ($P < 0.001$). Significativamente diferente do LPS: # ($P < 0.05$), ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$).

A produção de citocinas após incubação com geoprópolis está de acordo com dados anteriores de nosso grupo. Araújo e colaboradores (2015), analisando monócitos humanos incubados com geoprópolis, observaram que a concentração de 25 μ g/mL modulou a produção de citocinas, aumentando tanto a produção de TNF- α quanto de IL-10. Ademais, em trabalho publicado recentemente, a geoprópolis também induziu o aumento da produção de TNF- α por células THP-1 – uma linhagem celular utilizada nos ensaios imunológicos mimetizando monócitos humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2016). As células envolvidas na imunidade inata, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, são as principais atuantes no mecanismo de defesa contra micro-organismos. Após ativação destas células pelo antígeno, ocorre a liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como geração de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. Citocinas como o TNF- α são importantes

no processo de ativação de monócitos e macrófagos, enquanto que outras citocinas, como a IL-10, são consideradas fatores de desativação celular (SKRZECZYNSKA-MONCZNIK *et al.*, 2008). O TNF- α possui funções biológicas muito amplas, exercendo ação como mediador central da inflamação, induzindo expressão de moléculas de adesão, sobrevivência e diferenciação de células normais e morte de células tumorais, sendo um alvo para novos tratamentos de doenças inflamatórias e do câncer. A presença de TNF- α durante uma infecção é de suma importância, pois esta citocina é necessária para a ativação de células envolvidas na resposta imune e presentes nos órgãos linfoides secundários, sendo uma das responsáveis pela eficiente apresentação antigênica por células apresentadoras de antígenos (APCs) às células T virgens (LANGENKAMP *et al.*, 2000; SALLUSTO *et al.*, 2000). Em relação às células tumorais, uma das vias pelas quais o TNF- α pode agir sobre o ciclo celular é por meio das caspases. A interação da citocina com TNFR1 e 2 leva à morte celular mediada por caspase-8, que irá clivar a proteína Bid em uma forma truncada, que posteriormente se translocará para a mitocôndria, induzindo alteração do potencial de membrana mitocondrial e liberação de citocromo C para o citosol com consequente ativação do complexo apoptótico, resultando assim na morte celular (MACEWAN *et al.*, 2002; TURNER *et al.*, 2014).

Por outro lado, a IL-10 é conhecida por seu perfil anti-inflamatório. É uma citocina que foi inicialmente descrita como fator inibidor da síntese de citocinas do perfil Th1 em camundongos, e posteriormente evidenciaram sua ação inibitória sobre a produção de citocinas por células NK, células T, monócitos e macrófagos (MOORE *et al.*, 2001). Em contrapartida, conforme observado na revisão de Zhang e colaboradores (2010), a IL-10 possui ação também como promotora da proliferação de linfócitos B, ativação e aumento da proliferação de células NK, ativação de células T citotóxicas e aumento da expressão de TLR-4, demonstrando possuir ações ativadoras essenciais para o sistema imune. A ação desta citocina sobre TLR-4 foi observada no presente trabalho, uma vez que o tratamento com associação levou ao aumento da produção de IL-10 juntamente com o aumento da expressão de TLR-4, estando assim de acordo com a literatura.

Já em relação à produção de IL-1 β , conforme mencionado acima, não houve alterações em sua produção após incubação de monócitos humanos com a associação. Interleucina-1 β é uma citocina pró-inflamatória crucial na resposta imune inata, responsável pela produção de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico e a prostaglandina-E2, e expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais promovendo assim a passagem das células imunes da corrente sanguínea para o tecido inflamado (DINARELLO, 2009). Sua produção é dependente da interação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) com

receptores presentes nas células imunes (GUO *et al.*, 2015). Apesar do aumento da expressão de TLR-4 pela associação não foi observado o aumento concomitante de IL-1 β , assim a produção desta citocina pode estar sendo alterada por outras vias intracelulares. Esta citocina pode ser secretada através da via da autofagia: células imunes tratadas com LPS translocam IL-1 β para os autofagossomas e, quando esta via é bloqueada, a citocina é secretada para o meio extracelular (LOPEZ-CASTEJON & BROUGH, 2011). Esta via é responsável pela degradação de componentes intracelulares como organelas, pela defesa contra micro-organismos, desenvolvimento e envelhecimento celular. A autofagia é dependente de ATP e age por meio de hidrolases, digerindo o conteúdo internalizado no autofagossoma em simples peptídeos ou aminoácidos (MOLINO *et al.*, 2017). Além da autofagia, outra importante via relacionada a produção de IL-1 β é a via do inflamassoma. Após a internalização do antígeno, este pode interagir com o receptor *nod-like* P3 (NLRP3) e ativar a via do inflamassoma, iniciar a produção da pró-IL-1 β e sua clivagem na molécula funcional de IL-1 β . O inflamassoma é um complexo multiproteico responsável por interagir com sinais de perigo, como os intermediários reativos do oxigênio e ácidos nucleicos exógenos (SZABO & PETRASEK, 2015). O aumento observado na produção desta citocina em monócitos incubados com DOX, quando comparada ao controle, pode refletir um caráter inflamatório do quimioterápico ativando a via do inflamassoma.

A interleucina-6 também é uma importante citocina do sistema imunológico, pois possui ações pró- e anti-inflamatórias, e está envolvida na homeostase do metabolismo energético (SCHELLER *et al.*, 2011). O controle de produção de IL-6 está relacionado a duas importantes vias, NF- κ B e AP-1, e pode ser alterada devido à interação do antígeno com TLRs ou com estímulos regenerativos tais como TGF- α e - β (HUNGNESS *et al.*, 2000). Além dos receptores celulares a IL-10 também pode agir sobre a produção de IL-6, PBMCs e mastócitos quando tratados com IL-10 tem a produção de IL-6 diminuída ou até mesmo inibida (MOORE *et al.*, 2001). Em nosso trabalho, a associação geoprópolis + DOX inibiu a produção de IL-6 por monócitos, ou decorrente da sua ação sobre vias intracelulares ou pelo aumento da produção de IL-10.

A IL-6 também pode estar associada ao desenvolvimento de neoplasias. Camundongos induzidos quimicamente para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular apresentaram aumento na concentração sérica de IL-6, além disso, as células tumorais apresentaram grande taxa de mutações em genes relacionados à expressão de fatores de transcrição e da IL-6, aumentando sua produção, favorecendo o crescimento tumoral e resistência à quimioterapia (MAUER *et al.*, 2015). Uma vez que houve a diminuição da produção de IL-6, nossos

achados são interessantes, considerando seu papel na resposta imunológica, bem como no desenvolvimento tumoral.

Nossos dados evidenciaram que a associação geoprópolis + DOX induziu diferentes alterações na produção de citocinas, sugerindo uma possível ação diferencial sobre fatores de transcrição, uma vez que a produção de TNF- α está relacionada à via do NF- κ B, IL-10 à via do STAT3, secreção de IL-1 β relacionada às vias do inflamassoma e autofagia, e as vias do NF- κ B e AP-1 à produção de IL-6 (HUNGNESS *et al.*, 2000; LOPEZ-CASTEJON & BROUGH, 2011; IYER & CHENG, 2012; MITCHELL *et al.*, 2016). De modo geral, a utilização da associação de geoprópolis e doxorrubicina parece favorecer a ativação da resposta imune, estimulando a produção de TNF- α e IL-10, o que indica seu caráter ativador sobre monócitos humanos.

5.4. Expressão gênica e western blot para avaliação da via do NF- κ B e LC3

Uma vez que a produção das citocinas avaliadas no presente trabalho está sob controle de diferentes vias intracelulares, foram escolhidos dois dos possíveis alvos para a ação da associação: a via do NF- κ B e a da autofagia.

A análise comparativa demonstrou diminuição não significativa da expressão gênica do NF- κ B quando as células foram tratadas com GEO, DOX ou a associação e comparadas ao controle. A análise de Western blot revelou que a geoprópolis diminuiu a fosforilação do I κ B α quando comparada ao controle, porém a doxorrubicina e a associação mantiveram os níveis semelhantes ao controle.

Já a expressão gênica de LC3 foi diminuída significativamente por todos os tratamentos quando comparada ao controle, sendo interessante observar que a expressão desta proteína foi maior na presença de doxorrubicina quando comparada à associação (figura 5).

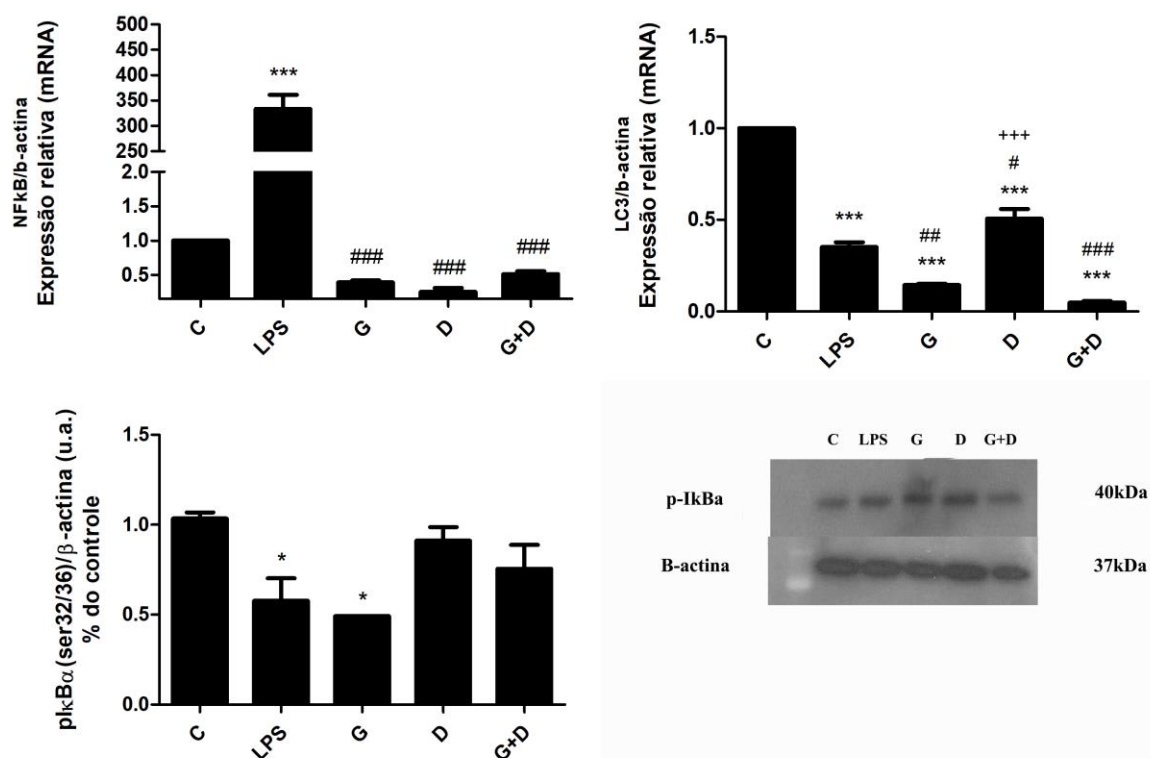


Figura 5. Expressão gênica relativa do LC3, NF-κB e expressão proteica da fosfo-IκBα (u.a. – unidades arbitrárias) por monócitos humanos incubados com RPMI 1640 (controle – C), LPS (10 μg/mL), geoprópolis (G – 25 μg/mL), doxorubicina (D – 1 μM), e associação (G+D) por 18 h. Significativamente diferente do controle: * ($P < 0.05$), *** ($P < 0.001$); significativamente diferente do LPS: # ($P < 0.05$), ## ($P < 0.01$), ### ($P < 0.001$); significativamente diferente da associação: +++ ($P < 0.001$).

Neste trabalho, foram observados níveis levemente menores na expressão de NF-κB e IκBα fosforilada, e alta produção de TNF-α. Esses achados sugerem uma via de ativação diferente para a produção desta citocina, como por exemplo a via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (SHEN et al, 2005), ou então a alta atividade do proteossoma (WONG & CUERVO, 2010). Além de sua ação na produção de citocinas, o NF-κB pode estar associado a efeitos colaterais da doxorubicina.

A doxorubicina é conhecida pela sua cardiotoxicidade, e há dados na literatura que associam a cardiotoxicidade com a ativação da via do NF-κB. Zhang e colaboradores (2016) trataram células H9c2 – uma linhagem celular de cardiomiócitos – com doxorubicina e avaliaram a ativação da via do NF-κB. As células tratadas com DOX entraram em apoptose. Porém, o *knockout* desta via revelou diminuição na apoptose, sugerindo que a ativação da via do NF-κB é necessária para o processo de morte dos cardiomiócitos. Dalmases e

colaboradores (2013) obtiveram resultados interessantes, analisando o padrão de expressão de células de câncer de mama tratadas com doxorrubicina, observando aumento da expressão de NF- κ B, com conseqüente quimioresistência e aumento da invasão pelas células tumorais. Entretanto, a ativação da via da p53 diminuiu a expressão de NF- κ B e induziu aumento da morte das células tumorais, levando-os à conclusão de que a diminuição da expressão do NF- κ B é importante para o bom prognóstico da doença e pode ser um alvo para tratamentos. A manutenção dos níveis de fosforilação do I κ B α no presente trabalho, na presença de doxorrubicina, está de acordo com a literatura, porém não houve alterações da viabilidade celular dos monócitos, sugerindo assim que esta via não induz morte de células fagocíticas.

A análise da expressão do gene LC3 revelou diminuição de sua expressão quando monócitos foram tratados com geoprópolis, doxorrubicina e a associação. Entretanto, o quimioterápico aumentou a expressão de LC3 quando comparado à associação, e também a produção de IL-1 β , o que sugere que a via de autofagia não está associada a altos níveis de IL-1 β , sendo a via do inflamassoma a possível responsável pela alta produção desta citocina (MOLINO *et al.*, 2017).

A autofagia também tem papel importante nos efeitos colaterais ocasionados pelo tratamento com doxorrubicina. Pesquisadores, também utilizando a linhagem H9c2, observaram aumento na indução de autofagia e conseqüente morte das células tratadas com doxorrubicina. Contudo, o acréscimo de grelina ao tratamento diminuiu a indução da autofagia e da apoptose dos cardiomiócitos, indicando que a adição deste hormônio ao tratamento foi capaz de diminuir um dos efeitos colaterais da doxorrubicina e de modular as vias de indução da autofagia (WANG *et al.*, 2014). Tacar & Dass (2013) publicaram uma revisão na qual discutiram o papel da autofagia no tratamento com doxorrubicina e, dentre os pontos levantados, relataram que a indução da autofagia é associada aos efeitos colaterais. Por outro lado, mencionaram também que a autofagia pode ser benéfica para o bom prognóstico do câncer, uma vez que esta via é responsável por destruir organelas danificadas e induzir morte celular. Assim, a alteração da via da autofagia depende muito da célula que está em questão.

O aumento da expressão de LC3 observado nos monócitos tratados com doxorrubicina em relação a tratamento com a combinação reflete uma possível ação do quimioterápico sobre as organelas, apesar de não ter sido observada diminuição da viabilidade celular. A utilização da associação diminuiu a expressão de LC3, demonstrando assim um caráter protetor desta combinação do quimioterápico com a geoprópolis.

5.5. Atividade microbicida

Após avaliação da produção de citocinas e expressão de marcadores de superfície, foram realizados experimentos para avaliar a atividade microbicida de monócitos tratados com geoprópolis, doxorubicina ou com a associação. A atividade fungicida dos monócitos não foi alterada por todos os tratamentos (figura 6).

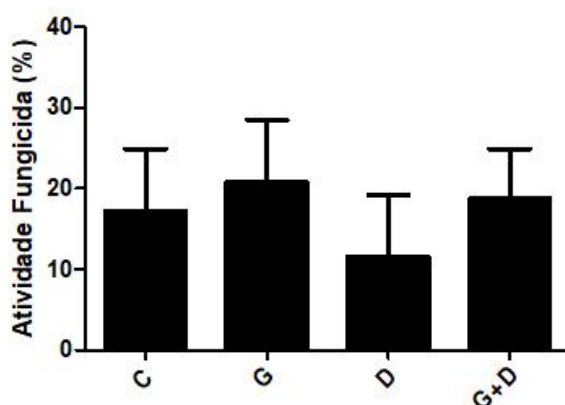


Figura 6. Atividade fungicida (%) de monócitos humanos incubados com RPMI 1640 (controle – C), geoprópolis (G – 25 µg/mL), doxorubicina (D – 1 µM) ou associação (G + D) por 18 h, e desafiados com *C. albicans* (monócitos/fungos 1:5) por 2 h.

Já em relação a atividade bactericida dos monócitos humanos desafiados com *E. coli* e com *S. mutans*, foi observado que a DOX diminuiu significativamente a atividade dos monócitos humanos desafiados com *E. coli* porém o acréscimo de GEO reverteu o quadro, aumentando a atividade bactericida destas células (figura 7A). A atividade frente ao desafio com *S. mutans* não foi alterada de forma significativa pelos tratamentos; entretanto é possível visualizar um discreto aumento quando os monócitos foram tratados com a associação (figura 7B).

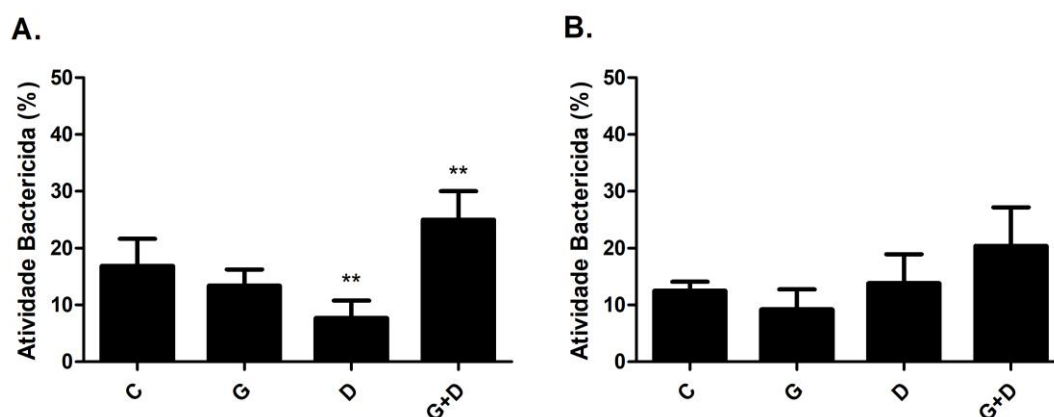


Figura 7. Atividade bactericida (%) de monócitos humanos incubados com RPMI 1640 (controle – C), geoprópolis (G – 25 µg/mL), doxorubicina (D – 1 µM) ou com a associação de ambos (G + D) por 18 h, e desafiados com *E. coli* (A) ou *S. mutans* (B) (monócitos/bactérias 1:5) por 2 h. Significativamente diferente do controle: ** ($P < 0.01$).

A capacidade dos monócitos em reconhecer e eliminar patógenos é importante, sendo, juntamente com os neutrófilos e macrófagos, a primeira defesa do organismo frente a microorganismos invasores. Halder e colaboradores (2017) demonstraram que monócitos do sangue periférico exercem atividade candidacida imediata e inibem sua germinação, destruindo a *C. albicans* via fagocitose, com descondensação do DNA nuclear e liberação deste DNA na forma de “armadilhas” extracelulares monocíticas, chamadas “MoETs”. A atividade microbicida de monócitos tem sido investigada após incubação destas células com produtos naturais, os quais vêm sendo estudados não somente por sua ação imunomoduladora, como também por serem fontes de novos medicamentos e tratamentos. Possamai *et al.* (2013) avaliaram a atividade fagocítica de células mononucleares sanguíneas tratadas com microesferas contendo própolis produzida por uma espécie da família Meliponinae. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato total de própolis foi mais eficiente em induzir a fagocitose de *C. albicans* pelas células mononucleares do que as frações em hexano, metanol, diclorometano e acetato de etila. A utilização das microesferas contendo própolis foi ainda mais eficiente na indução da fagocitose e na indução da produção de ânion superóxido frente ao estímulo com o fungo. Os autores concluíram que a utilização das microesferas contribuiu para a ação biológica da própolis. Em trabalho recente de nosso grupo, Cardoso e colaboradores (2017) avaliaram a ação fungicida da própolis sobre monócitos desafiados com *C. albicans*, o que foi superior ao controle. Por outro lado, em relação ao presente trabalho, apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos, pode-se notar uma

diminuição na atividade fungicida acarretada pela doxorrubicina, assim o quimioterápico poderia afetar biologicamente a atividade microbica de monócitos.

Trabalhos anteriores do grupo já demonstraram a atividade bactericida da geoprópolis diretamente sobre as culturas bacterianas. Araújo e colaboradores (2015) trataram culturas de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* diretamente com geoprópolis, os resultados demonstraram que não houve atividade bactericida, entretanto quando associaram a geoprópolis com cloranfenicol a atividade bactericida foi superior ao antibiótico isoladamente, evidenciando assim uma ação sinérgica. Recentemente, Cardoso e colaboradores (2017) demonstraram que monócitos humanos que foram incubados com ácido cinâmico, um componente da própolis, tiveram sua atividade bactericida frente a *E. coli* aumentada quando comparada ao controle e a própolis sozinha. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram uma ação sinérgica da doxorrubicina com a geoprópolis sobre a atividade bactericida dos monócitos desafiados com *E. coli*, esse sinergismo é interessante do ponto de vista dos pacientes oncológicos pois poderia ajudar no combate a uma das infecções bacterianas mais comum entre os pacientes que estão fazendo uso de quimioterápicos (BADEN *et al.*, 2012).

Dados da literatura demonstraram a ação da própolis sobre bactérias orais, principalmente *S. mutans*. Santiago e colaboradores (2016) avaliaram a atividade microbica de monócitos tratados com própolis frente ao desafio com *S. mutans*, e observaram que o tratamento com este apiproduto aumenta significativamente a capacidade bactericida dos monócitos. Ainda em relação à atividade bactericida contra *S. mutans*, Conti e colaboradores (2016) evidenciaram a ação moduladora da própolis sobre DCs: células tratadas com o apiterápico nas maiores concentrações (10, 20 e 40 µg/mL) tiveram sua atividade bactericida aumentada significativamente quando comparada ao controle.

Koo e colaboradores (2002) realizaram ensaios da atividade bactericida dos compostos isolados da própolis, após avaliarem o MIC dos diferentes compostos isolados sobre diferentes *Streptococcus*, os pesquisadores concluíram que os flavonoides, dihidroflavonoides e sesquiterpenos foram os mais bacteriostáticos e bactericidas dentre os compostos testados. A composição química da geoprópolis já foi elucidada (ARAÚJO *et al.*, 2015), e não foi observado quantidades significativas de flavonoides, dihidroflavonoides e sesquiterpenos, possivelmente a ausência de tais componentes pode estar relacionada a atividade bactericida não significativa sobre a cepa de *S. mutans*, evidenciada no presente trabalho.

5.6. Produção de peróxido de hidrogênio

A atividade microbicida e a produção de espécies reativas do oxigênio estão intimamente relacionadas. Assim, a produção de H_2O_2 por monócitos humanos foi avaliada, sendo possível evidenciar leve redução na produção desta molécula nos monócitos tratados com geoprópolis, enquanto a DOX foi responsável pela maior redução na produção de peróxido de hidrogênio. Contudo, a associação de geoprópolis + DOX impediu a ação deste quimioterápico, mantendo os níveis basais quanto à produção de H_2O_2 (figura 8).

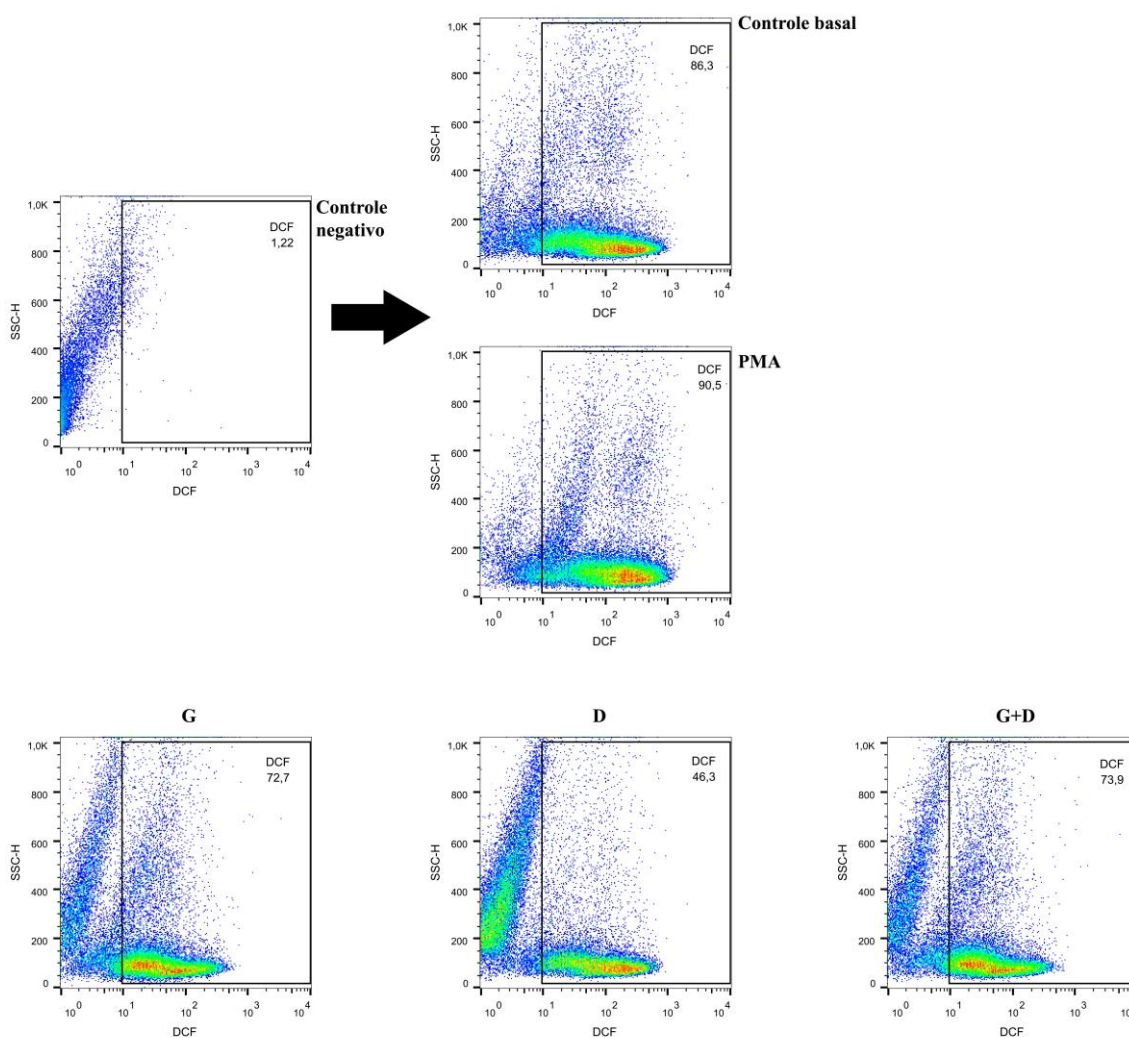


Figura 8. Dot Plots representativos de células marcadas com DCF+ após incubação com meio RPMI 1640 (controle basal), PMA (3 μ M/mL), geoprópolis (G – 25 μ g/mL), doxorrubicina (D – 1 μ M), ou associação (G+D) por 18 h. O gate de células DCF+ foi delineado em controle negativo (autofluorescente).

A diminuição dos níveis de H_2O_2 em monócitos tratados com doxorrubicina pode estar relacionada à sua menor atividade bactericida e fungicida, como já fora demonstrado. Vale ressaltar que a adição de geoprópolis impediu tanto a diminuição da atividade fungicida e bactericida, quanto a diminuição da produção de H_2O_2 induzida pela DOX, propiciando assim melhor atividade dos monócitos e evidenciando a ação benéfica da associação.

A ação da GEO na produção de H_2O_2 é desconhecida, porém já é conhecida a ação da própolis. Trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram aumento da produção desta molécula quando macrófagos murinos foram incubados com as concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de própolis (ORSI *et al.*, 2000). Recentemente, também demonstramos que a própolis e alguns de seus componentes isolados ou em combinação (ácido cafeico e cinâmico) são capazes de induzir aumento significativo na produção de H_2O_2 por monócitos humanos, fato este que sugere uma ação conjunta dos vários componentes da própolis (CARDOSO *et al.*, 2017). Assim como a própolis, a geoprópolis é composta por diferentes substâncias, as quais podem ter ação sinérgica sobre os monócitos induzindo as respostas observadas no presente trabalho.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem concluir que a associação de geoprópolis com doxorrubicina não é citotóxica para monócitos humanos, e possui ação imunomoduladora, favorecendo a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-10 e a expressão de TLR-4 e CD80 . Já as vias do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e LC3 foram diminuídas pela associação, revelando assim um caráter desativador sobre as vias analisadas.

Foi observado também que a doxorrubicina diminuiu alguns dos parâmetros analisados, como a atividade fungicida e microbicida e a produção de H_2O_2 . Contudo, o acréscimo de geoprópolis parece impedir este quadro. Assim, a utilização da associação permitiria a diminuição da concentração de uso da doxorrubicina e dos efeitos adversos causados pelo tratamento quimioterápico, principalmente em células imunes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACS, American Cancer Society, Cancer Statistics Center, <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/> acessado em 02/09/17.
- ALBINI, A.; PENNESI, G.; DONATELLI, F.; CAMMAROTA, R.; DE FLORA, S.; NOONAN, D.M. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. **Journal of National Cancer Institute**, v. 102, p. 14-25, 2010.
- AMBROZ, M.; HANUSOVA, V.; SKARKA, A.; BOUSOVA, I.; KRALOVA, V.; LANGHASOVA, L.; SKÁLOVÁ, L. Essential oil from *Myrica rubra* leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. **Planta Medica**, v. 82, p. 89-96, 2016.
- ARAÚJO, M.J.A.M.; BÚFALO, M.C.; CONTI, B.J.; FERNANDES JR, A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, p. 12-20, 2015.
- BADEN, L.R.; BENSINGER, W.; ANGARONE, M.; CASPER, C.; DUBBERKE E.R.; FREIFELD, A.G.; GARZON, R.; GREENE, J.N.; GREER, J.P.; ITO, J.I.; KARP, J.E.; KAUL, D.R.; KING, E.; MACKLER, E.; MARR, K.A.; MONTOYA, J.G.; MORRIS-ENGEMANN, A.; PAPPAS, P.G.; ROLSTON, K.; SEGAL, B.; SEO, S.K.; SWAMINATHAN, S.; NAGANUMA, M.; SHEAD, D.A. Prevention and treatment of cancer-related infections. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 10, p. 1412-1445, 2012.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.
- BARTOLOMEU, A.R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; da SILVA, L.M.; ROMAGNOLLI, G.G.; de OLIVEIRA, D.E.; SFORCIN, J.M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48-55, 2016.
- BOX, V.G.S. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, p. 14-19, 2007.
- BROWN, S.A.; SANDHU, N.; HERRMANN, J. Systems biology approaches to adverse drug effects: the example of cardio-oncology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, p. 718-731, 2015.
- 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, p. 1-14, 2015.

- BÚFALO, M.C.; BORDON-GRACIANIA, 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. 1497-1504, 2014.
- BYUN, M.W. *Schizonepeta tenuifolia* ethanol extract exerts anti-inflammatory activity through the inhibition of TLR4 signaling in lipopolysaccharide-stimulated macrophage cells. **Journal of Medical Food**, v. 17, p. 350-356, 2014.
- CARDOSO, E.O.; CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; CONTE, F.L.; OLIVEIRA, L.P.G.; HERNANDES, R.T.; GOLIM, M.A.; SFORCIN, J.M. 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.
- CARLSON, L.J.; COTE, B.; ALANI, A.W.G.; RAO, D.A. Polymeric micellar codelivery of resveratrol and curcumin to mitigate in vitro doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2315-2322, 2014.
- CARVALHO, C.; SANTOS, R.X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P.J.; SANTOS, M.S.; MOREIRA, P.I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3267-3285, 2009.
- CHANPUT, W.; MES, J.J.; VREEBURG, R.A.M.; SAVELKLOUL, H.F.J.; WICHERS, H.J. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food derived compounds. **Food & Function**, v. 1, p. 254-261, 2010.
- CINEGAGLIA, N.C.; BERSANO, P.R.O.; ARAÚJO, M.J.A.M.; BÚFALO M.C.; SFORCIN, J.M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 1-6, 2013.
- CONTI, B.J.; BÚFALO, M.C.; GOLIM, M.A.; BANKOVA, V.; SFROCIN, 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.; CARDOSO, E.O.; FREIRE, P.P.; CARVALHO, R.F.; GOLIM, M.A.; SFROCIN, J.M. Propolis modulates miRNAs involved in TLR4 pathway, NF-kB activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1604-1612, 2016.
- CUNHA, M.G.; FRANCHIN, M.; DE CARVALHO, G.L.C.; DE RUIZ, A.L.; DE CARVALHO, J.E.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S.M.; KOO, H.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **Complementary Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-9, 2013.

- DALMASES, A.; GONZÁLEZ, I.; MENENDEZ, S.; ARPÍ, O.; COROMINAS, J.M.; SERVITJA, S.; TUSQUETS, I.; CHAMIZO, C.; RINCÓN, R.; ESPINOSA, L.; BIGAS, A.; EROLES, P.; FURRIOL, J.; LLUCH, A.; ROVIRA, A.; ALBANELL, J.; ROJO, F. Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF- κ B target genes in human breast cancer. **Oncotarget**, v. 5, p. 196-210, 2013.
- DEMAIN, A.L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microbiology Biotechnology*, v. 4, p. 687-699, 2011.
- DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519-550, 2009.
- DUARTE, V.M.; HAN, E.; VEENA, M.S.; SALVADO, A.; SUH, J.D.; LIANG, L.J.; FAULL, K.F.; SRIVATSAN, E.S.; WANG, M.B. Curcumin enhances the effect of cisplatin in suppression of head and neck squamous cell carcinoma via inhibition of IKKbeta protein of the NFkappaB pathway. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, p. 2665-2675, 2010.
- DUTRA, R.P.; ABREU, B.V.B.; CUNHA, M.S.; BATISTA, M.C.A.; TORRES, L.M.B.; NASCIMENTO, F.R.F.; RIBEIRO, M.N.S.; GUERRA, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2549-2557, 2014.
- EID, S.Y.; EL-READI, M.Z.; WINK, M. Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 19, p. 12881297, 2012.
- ELGUETA, R.; BENSON, M.J.; VRIES, V.C.; WASIUK, A.; GUO, Y.; NOELLE, R.J. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. **Immunological Reviews**, v. 229, p. 1-31, 2009.
- FACINA, T. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, p. 63-64, 2014.
- FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 2893–2917, 2010.
- FORSEA, A.M.; del MARMOL, V.; de VRIES, E.; BAILEY, E.E.; GELLER, A.C. Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities. **The British Journal of Dermatology**, v. 167, p. 1124-1130, 2012.
- FRIÓN-HERRERA, Y.; DIAZ-GARCIA, A.; RUIZ-FUENTES, J.; RODRIGUEZ-SÁNCHEZ, H.; SFORCIN, J.M. Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, p. 1448-1456, 2015.

- FRICKE, I.; MITCHELL, D.; MITTELSTADT, J.; LEHAN, N.; HEINE, H.; GOLDMANN, T.; BOHLE, A.; BRANDAU, S. Mycobacteria induce IFN- γ production in human dendritic cells via triggering of TLR2. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 5173-5182, 2006.
- GARCIA, I.; POUZET, C.; BRULAS, M.; BAUZA, E.; BOTTO, J.M.; DOMLOGE, N. Evaluation of THP-1 cell line as an in vitro model for long-term safety assessment of new molecules. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, 568-574, 2013.
- GUO, H.; CALLAWAY, J.B.; TING, J.P.Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, p. 677-687, 2015.
- HALDER, L.D.; ABDELFAH, M.A.; JO, E.A.H.; JACOBSEN, I.D.; WESTERMANN, M.; BEYERSDORF, N.; LORKOWSKI, S.; ZIPFEL, P.F.; SKERKA, C. Factor H binds to extracellular DNA traps released from human blood monocytes in response to *Candida albicans*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 114, 2017.
- HIGASHI, M.; TOKUHIRA, M.; FUJINO, S.; YAMASHITA, T.; ABE, K.; ARAI, E.; KIZAKI, M.; TAMARAU, J. Loss of HLA-DR expression is related to tumor microenvironment and predicts adverse outcome in diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 2015, p. 1-6, 2015.
- HO, Y.P.; AU-YEUNG, S.C.; TO, K.K. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. **Medical Research Review**, v. 23, p. 633-655, 2003.
- HOLOHAN, C.; SCHAEYBROECK, S.V.; LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 714-726, 2013.
- HOLLAND, T.; FOWLER JR, V.G.; SHELBURNE, S.A. Invasive gram-positive bacterial infection in cancer patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, p. 331334, 2014.
- HONG, C.H.L.; NAPEÑAS, J.J.; HODSON, B.D.; STOKMAN, M.A.; MATHERS-STAUFFER, V.; ENTING, L.S.; SPIJKERVET, F.K.L.; BRENNAN, M.T. A systematic review of dental disease in patients undergoing cancer therapy. **Support Cancer Care**, v. 18, p. 1007-1021, 2010.
- HUNGNESS, E.S.; PRITTS, T.A.; LUO, G.J.; SUN, X.; PENNER, C.G.; HASSELGREN, P.O. The transcription factor activator protein-1 is activated and interleukin-6 production is increased in interleukin-1beta-stimulated human enterocytes. **Shock**, v. 14, p. 386-391, 2000.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer, 2016
<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016>.
- IYER, S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, p. 23-63, 2012.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **Cancer Journal for Clinics**, v. 61, p. 69-90, 2011.
- JIANG, N.; WANG, X.; YANG, Y.; DAI, W. Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment. **Mini Reviews in Medical Chemistry**, v. 6, p. 885-895, 2006.

- KIM, O.Y.; MONSEL, A.; BERTRAND, M.; CORIAT, P.; CAVAILLON, J.M.; ADIB-CONQUY, M. Differential down-regulation of HLA-DR on monocytes subpopulations during systemic inflammation. **Critical Care**, v. 14, p. 1-12, 2010.
- KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1302-1309, 2002.
- KUCZYNSKI, E.A.; SARGENT, D.J.; GROTHEY, A.; KERBEL, R.S. Drug rechallenge and treatment beyond progression – implications for drug resistance. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, p. 571-587, 2013.
- LANGENKAMP, A.; MESSI, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. **Nature Immunology**, v. 1, p. 311-316, 2000.
- LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAÚJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-7, 2011.
- LOKICH, J.; ANDERSON, N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: An analysis of the literature. **Annals of Oncology**, v. 9, p. 341-341, 1998.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 189-195, 2011.
- MACEWAN, D.J. TNF receptor subtype signaling: differences and cellular consequences. **Cellular Signaling**, v. 14, p. 477-492, 2002.
- MACKALL, C.L.; FLEISHER, T.A.; BROWN, M.R.; MAGRATH, I.T.; SHAD, A.T.; HOROWITZ, M.E.; WEXLER, L.H.; ADDE, M.A.; MCCLURE, L.L.; GRESS R.E. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. **Blood**, v. 84, p. 2221-2228, 1994.
- MARKIEWICZ-ZUKOWSKA, R.; BORAWSKA, M.H.; FIEDOROWICZ, A.; NALIWAJKO, S.K.; SAWICKA, D.; CAR, H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. **Complementary Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-9, 2013.
- MAUER, J.; DENSON, J.L.; BRÜNING, J.C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. **Trends in Immunology**, v. 36, p. 92-101, 2015.
- MILROY, R. A randomized clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small cell lung cancer. West of Scotland Lung Cancer Research Group, and the Aberdeen Oncology Group. **British Journal of Cancer**, v. 68, p. 813-818, 1993.

- MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 185-229, 2004.
- MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMAN, A. Signaling via the NF κ B system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, p. 227-241, 2016.
- MOLINO, D.; ZEMIRLI, N.; CODOGNO, P.; MOREL, E. The journey of the autophagosome through mammalian cell organelles and membranes. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, p. 497-514, 2017.
- MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MOSEL, D.D.; BAUER, R.L.; LYNCH, D.P.; HWANG, S.T. Oral complications in the treatment of cancer patients. **Oral Diseases**, v. 17, p. 550-559, 2011.
- MURAD, J.M.; CALVI, S.A.; SOARES, A.M.V.C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 331-334, 2002.
- NETEA, M.G.; BROWN, G.D.; KULLBERG, B.J.; GOW, N.A.R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 67-78, 2008.
- NGO, D.; JIA, J.B.; GREEN, C.S.; GULATI, A.T.; LALL, C. Cancer therapy related complications in the liver, pancreas, and biliary system: an imaging perspective. **Insights into Imaging**, v. 6, p. 665-677, 2015.
- NOGUEIRA-NETO, P.A. A criação de abelhas indígenas sem ferrão. **São Paulo: Nogueirapis**; 1997, 446 p.
- OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C.G.; GABRIELSON, K.L.; JANSSENS, S.; CRIJNS, H.J.; MOENS, A.L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, p. 1213-1225, 2012.
- OLIVEIRA, L.P.G.; CONTE, F.L.; CARDOSO, E.O.; CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; GOLIM, M.A.; CRUZ, M.T.; SFORCIN, J.M. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1551-1558, 2016.
- ONYEMA, O.O.; DECOSTER, L.; NJEMINI, R.; FORTI, L.N.; BAUTMANS, I.; DE WAELE, M.; METS, T. Shifts in subsets of CD8+ T-cells as evidence of immune senescence in patients with cancers affecting the lungs: an observational case control study. **BMC Cancer**, v. 15, p. 1-11, 2015.
- ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, p. 205-219, 2000.

- ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 359- 368, 2005.
- ORŠOLIĆ, N. A review of propolis antitumor action *in vivo* and *in vitro*. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 2, p. 1-20, 2010.
- ORŠOLIĆ, N.; CAR N.; LISICIC, D.; BENKOVIC, V.; KNEZEVIC, A.H.; DIKIC, D.; PETRIK, J. Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on Ehrlich ascites tumor in mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 4395-4405, 2013.
- POMMIER, Y.; POURQUIER, P.; URASAKI, Y.; WU, J.; LACO, G.S. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 2, p. 307-318, 1999.
- POSSAMAI, M.M.; HONORIO-FRANÇA, A.C.; REINAQUE, A.P.B.; FRANÇA, E.L.; SOUTO, P.C.S. Brazilian propolis: a natural product that improved the fungicidal activity by blood phagocytes. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- QIN, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. **Atherosclerosis**, v. 221, p. 2– 11, 2012.
- SALLUSTO, F.; MACKAY, C.R.; LANZAVECCHIA, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 593-620, 2000.
- SANTIAGO, K.B.; CONTI, B.J.; CARDOSO, E.O.; GOLIM, M.A.; SFORCIN, J.M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. **Pathogenes and Diseases**, v. 74, p. 1-20, 2016.
- SANTOS, H.F.; CAMPOS, J.F.; SANTOS, C.M.; BALESTIERI, J.B.P.; SILVA, D.B.; CAROLLO, C.A.; SOUZA, K.P.; ESTEVINHO, L.M.; SANTOS, E.L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geoprópolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1-18, 2017.
- SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878-888, 2011.
- SCHUURHUIS, G.J.; VAN HEIJNINGEN, T.H.; CERVANTES, A.; PINEDO, H.M.; DE LANGE, J.H.; KEIZER, H.G.; BROXTERMAN, H.J.; BAAK, J.P.; LANKELMA, J. Changes in subcellular doxorubicin distribution and cellular accumulation alone can largely account for doxorubicin resistance in SW-1573 lung cancer and MCF-7 breast cancer multidrug resistant tumour cells. **British Journal of Cancer**, v. 68, p. 898-908, 1993.

- SFORCIN, J.M.; NOVELLI, E.L.B.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 224-254, 2002.
- SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.
- SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253-260, 2011.
- SFORCIN, J.M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy**, v. 30, p. 894-905, 2016.
- SHANKAR, A.; ROY, S.; MALIK, A.; JULKA, P.; RATH, G. Prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in cancer patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 6207-6213, 2015.
- SHEN, J.; SAKAIDA, I.; UCHIDA, K.; TERAJ, S.; OKITA, K. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. **Life Sciences**, v. 77, p. 1502-1515, 2005.
- SIDDIK, Z.H. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: DNAinteractive alkylating agents and antitumor platinum-based drugs. **The Cancer Handbook: John Wiley & Sons, Ltd**; 2005. 1723p.
- SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, J., BZOWSKA, M., LOSEKE, S., GRAGEGRIEBENOW, E., ZEMBALA, M., PRYJMA, J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, p. 152-159, 2008.
- SURMELI, Z.; GURSOY, P.; ERDOGAN, A.P.; BOZKURT, E.; ATMACA, H.; UZUNOGLU, S.; SEZGIN, C.; ŞANLI, U.A.; USLU, R.; KARACA, B. Combination of zoledronic acid and serine/threonine phosphatase inhibitors induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cells via inhibition of PI3K/Akt pathway. **Tumour Biology**, v. 2015, p. 1-9, 2015.
- SZABO, G; PETRASEK, J. Inflammasome activation and function in liver disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Pathology**, v. 12, p. 387-400, 2015.
- TACAR, O.; DASS, C.R. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 1577-1589, 2013.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, p. 1-14, 2005.
- TURNER, M.D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D.J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, p. 2563-2582, 2014.

- WANG, X.; WANG, X.L.; CHEN, H.L.; WU, D.; CHEN, J.C.; WANG, X.X.; LI, R.L.; HE, J.H.; MO, L.; CEN, X.; WEI, Y.Q.; JIANG, W. Ghrelin inhibits doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting excessive autophagy through AMPK and p38-MAPK. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, p. 334-350, 2014.
- WATANABE, M.A.E.; AMARANTE, M.K.; CONTI, B.J.; SFORCIN, J.M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, 1378-1386, 2011.
- WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309-317, 2004.
- WONG, E.; CUERVO, A.M. Integration of clearance mechanisms: The proteasome and autophagy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-19, 2010.
- WOOD, G.S.; WU, J. Methotrexate and pralatrexate. **Dermatologic Clinics**, v.33, p.747-755, 2015.
- ZHANG, Y.; KIM, H.J.; YAMAMOTO, S.; KANG, X.; MA, X. Regulation of interleukin-10 gene expression in macrophages engulfing apoptotic cells. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, p. 113-121, 2010.
- ZHANG, D.X.; MA, D.Y.; YAO, Z.Q.; FU, C.Y.; SHI, Y.X.; WANG, Q.L.; TANG, Q.Q. ERK1/2/p53 and NF- κ B dependent-PUMA activation involves in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 2435, 2442, 2016.

MANUSCRITO

Monocytes functions may be preserved by geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith during chemotherapy

Lucas Pires Garcia Oliveira¹, Fernanda Lopes Conte¹, Eliza de Oliveira Cardoso¹, Bruno José Conti¹, Karina Basso Santiago¹, Marjorie de Assis Golim², Geórgia da Silva Feltran¹, Willian Fernando Zambuzzi¹ and José Maurício Sforcin¹

¹ *São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Campus Botucatu, Brazil*

² *Botucatu Blood Center, School of Medicine, UNESP, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil*

SUMMARY

Cancer is a disease that strikes people on many continents, resulting in millions of deaths annually. Although chemotherapy has been widely used, it leads to side effects and different survival rates among patients. This study aimed to elucidate whether geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin (DOX) could affect nontumor cells, evaluating their immunomodulatory effects on human monocytes. Cell viability, expression of cell markers (HLA-DR, TLR-2, TLR-4, C80 and CD40), cytokine production (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10), intracellular pathways (NF- κ B and LC3), the microbicidal activity of monocytes and H₂O₂ production were analyzed. Data showed that geopropolis + DOX stimulated TNF- α and IL-10 production, diminished IL-6 secretion and increased TLR-4 and CD80 expression and bactericidal activity, without affecting the H₂O₂ production, NF- κ B and LC3 pathway. Thus, the combination geopropolis + DOX displays immunomodulatory effects without affecting the viability of monocytes, and could reduce the concentration of DOX and its side effects.

Keywords: geopropolis; monocytes; chemotherapy; immunomodulation.

INTRODUCTION

Cancer is a disease that strikes people in all continents, resulting in millions of deaths annually. The American Cancer Society (ACS) predicted in 2017 about 1.6 million new cases of cancer and 600000 deaths from the disease. Tumor treatment may comprise the use of antitumor drugs such as carboplatin, methotrexate, doxorubicin, and others. Although chemotherapy has been widely employed, it leads to side effects due to lack of selectivity between normal and tumor cells, different survival rates among patients, and advances in applied therapeutics still cannot assure successful cancer treatment.¹⁻³ Monocytopenia is one of the undesired side effects of chemotherapy.⁴

Monocytes can ‘patrol’ the vessel walls and have endothelial cell-supporting functions; moreover, they have the ability to transmigrate across the endothelium and enter the tissues in response to appropriate signals. Recently, it has been proposed that migrating monocytes can either remain as monocytes within the tissue, acquiring antigen-presenting capability or differentiate into macrophages.⁵ They exert a crucial role in the innate immune system by recognizing pathogens due to the presence of pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLR) that recognize a variety of pathogens and damage associated molecular patterns (PAMPs and DAMPs), priming a pro-inflammatory immune response.⁶ ⁷ The activation of transcription factors lead to the gene expression of cytokines, chemokines, antimicrobial peptides and co-stimulatory molecules. Monocytes may link innate and adaptive responses by processing antigens, expressing human leukocyte antigen molecules, responsible for presenting peptides, as well as co-stimulatory molecules for T cell activation. During chemotherapy, monocytopenia may compromise the immune response, although it allows clinical oncologists and physicians to select a proper chemotherapy protocol.⁴

Previous findings of our group revealed that the cytotoxic action of chemotherapeutic agents against tumor cells may be potentiated in association with geopropolis.⁸ Geopropolis is a stingless bee product made of wax, plant exudates, pollen, some glands secretion and soil. Stingless bees (Meliponinae) belong to a large group of bees found in tropical and subtropical regions of the planet. Geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Maranhão State, Brazil, has been shown to exert cytotoxic effects against tumor cells, antimicrobial action and immunomodulatory effects.⁹⁻¹¹ Doxorubicin (DOX) associated with geopropolis exerted a synergistic effect on HEp-2 cells, what suggested that this combination could be a novel clinical chemotherapeutic approach for cancer treatment, reducing DOX concentration.

Although geopropolis + DOX exerted cytotoxic effects to tumor cells, a possible effect of this combination on the innate immunity could take place and, in continuity, our group investigated the effects of geopropolis + DOX on THP-1 cells – a human leukaemia monocytic cell line used as a model to study monocyte activity in vitro, due to their uniform genetic background. However, considering the high variability among individuals undergoing chemotherapy, the purpose of this work was to elucidate the effects of geopropolis + DOX on monocytes isolated from healthy blood donors by assessing cell viability, expression of cell markers (HLA-DR, TLR-2, TLR-4, CD80 and CD40), intracellular pathways (NF- κ B and LC3), cytokine production (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10), the fungicidal activity against *Candida albicans*, the bactericidal activity against *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* and H₂O₂ production.

MATERIALS AND METHODS

Doxorubicin, geopropolis and their combination

Doxorubicin (Bergamo, Taboão da Serra, SP, Brazil) was diluted in RPMI 1640 culture medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal calf serum (complete medium) to obtain 1 μ M. This concentration was established according to literature and to previous assays standardized in our laboratory.¹²⁻¹⁵

Geopropolis was produced by *M. fasciculata* Smith in Palmeirândia (2° 39' S, 44° 55' O), Maranhão State, northeast Brazil and kept at 4 °C before extraction.^{9,16} A sample of 30 g was ground and macerated in 70% ethanol (100 ml) at room temperature under moderate shaking. After 24 h, the extract was filtered and its dry weight was calculated (9.6 mg/ml) Geopropolis was diluted in RPMI 1640 culture medium to obtain 25 μ g/ml.

The combination geopropolis/DOX was prepared using 25 μ g/ml and 1 μ M, respectively.

Human monocytes culture

Blood samples (20 ml), obtained from 10 healthy adult volunteers, were collected and placed in sterile tubes containing 200 μ l of heparin. Subsequently, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll-Paque Plus (GE, Boston, MA, EUA) gradient separation by centrifugation for 30 minutes at 400 x G. The interface layer of the PBMC was

aspirated and washed twice with RPMI at 300 x G for 10 min. Thereafter, the supernatant was discarded and the pellet of cells resuspended in 1 ml of complete RPMI medium. Monocytes (1×10^6 monocytes/ml) were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 2 h. Non-adherent cells were removed and monocytes were incubated with the stimuli for performing the experiments. As control the cells were incubated with complete medium alone.

This study was approved by the Ethics Committee of Botucatu Medical School (CAAE: 6827 1617.8.0000.5411). An informed consent was signed by all the blood donors.

Monocytes viability

Cell viability was analyzed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) colorimetric assay with some modifications.¹⁷ After 18 h incubation with stimuli in absence or presence of lipopolysaccharide (LPS 10 µg/ml – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), culture medium was replaced by 300 µl of MTT (1 mg/ml) and incubated for 3 h. Afterwards, MTT was removed and 200 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added. The absorbance was read at 540 nm and the percentage of monocyte viability was calculated by the formula: (O. D. test/O. D. control) x 100.

Cell markers determination by flow cytometry

Monocytes (1×10^6 cells/ml) were distributed (500 µl) into polystyrene tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for cytometric analysis. TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD80 and CD40 expression by human monocytes were evaluated after 18 h incubation with control, GEO, DOX and their combination. Cells were washed and incubated for 30 min in the dark at 4 °C with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC)-conjugated monoclonal antibodies (0.5 µg/ml – Biolegend Inc., San Diego, CA, USA), as follows: anti-TLR-2-FITC (clone TL2.1), anti-TLR-4-PE (clone HTA125), anti-HLA-DR-FITC (clone L243), anti-CD80-PE (clone 2D10), anti-CD40-APC (clone 5C3) and anti-CD14- PerCP/Cy5.5 (clone HCD14). Isotypic antibodies labelled with fluorochromes of the respective tests (FITC, PE, PerCP/Cy5.5 and APC) were used as isotypic control. After incubation (4 °C, 30 min), cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A CellQuest Software (Cell Quest Software, San Jose, CA, USA) was used to analyze 30000 events. Cell gates were established on the basis of size

parameters (FSC) and granularity (SSC). Results were expressed as percentage of cells expressing the markers in the surface, obtained for the gated CD14-positive cells.

Cytokine quantification

IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10 production by monocytes was analyzed by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Briefly, a 96 well flat bottom Nunc Maxisorp (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was coated with capture antibody specific to each cytokine. The plate was washed and blocked before 100 μ l of the supernatants and serially diluted specific standards were added to the respective wells. After washing, the cytokine was detected using specific conjugated antibody. The substrate reagent was added to the wells and plates were read at 450 nm after color development, using an ELISA microplate reader.¹⁸

RNA extraction

Total RNA was obtained from the upper aqueous phase from the lower organic phase of TRIzol by the TRIzol-based method. Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Subsequently, RNA integrity and concentration were measured spectrophotometrically using a Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader with Take3 Trio Micro-Volume plate accessories (BioTek, Winooski, VT, USA).

Gene expression analysis

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using a QuantStudio® 3 Real-Time PCR System to assess changes in mRNA expression in the genes reported in Table 1. Total RNA was extracted from cells with Ambion TRIzol Reagent (Life Sciences – Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) and treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). cDNA synthesis was performed with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. qPCR was carried out in a total of 10 μ l, containing PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x (5 μ l) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.4 μ M of each primer, 100 ng of

cDNA and nuclease free H₂O. Fold changes were analyzed using the comparative CT method ($\Delta\Delta Ct$) normalizing to β -actin expression and comparing to static conditions as a reference.

Table 1. Expression primers sequences and PCR cycle conditions.

Gene (ID)	Primer	5'- 3' Sequence	Reaction Conditions
NFkB (4790)	Forward	CACCTGTTCCAAAGAGCACC	95°C - 15s; 67°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	GGTTCAGGAGCTGCTGAAAC	
LC3 (84557)	Forward	CTTCTGAGCCAGCAGTAGGG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	GAGGGACAACCCTAACACGA	
Actin (60)	Forward	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s
	Reverse	GCGGCGATATCATCATCC	

Western blot analysis

After 18 h incubation, blood monocytes cells were rinsed with PBS, pH = 7.4 and lysed for 1 h on ice in RIPA buffer supplemented with protease inhibitors (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to manufacturer's instructions. Subsequently, protein extracts were cleared by centrifugation. After protein concentration and quantification by Lowry Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), an equal amount of each protein (75 μ g) was separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF-membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). After blocking with 1% fat-free dried milk in Tris-buffered saline (TBS) with 0.05% Tween 20 (TBST), the membrane was exposed overnight at 4°C to primary antibodies detecting phospho-I κ B α (1/1000) and β -actin (1/1000) as loading control. Revelation was performed by incubating the membrane for 1 h at room temperature with secondary horseradish peroxidase-conjugated and anti-mouse (1/5000), followed by ECL detection (Abcam, Cambridge, UK). Band intensities were thereafter quantified using ImageJ software and graphics were prepared using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Microbicidal activity of human monocytes

Monocytes were distributed in the culture plates (1 x 10⁶ cells/ml) and incubated with the treatments for 18 h at 37 °C. After, supernatants from the cell cultures were removed and cells were challenged with *Candida albicans* (SC 5314), *Escherichia coli* (ATCC 43895) and *Streptococcus mutans* (CCT 3440), in the ratio of 1:5 monocyte/fungi or bacteria.

Microorganisms incubated only with culture medium and plated were used as control. After 2 h at 37 °C, supernatants were collected, and the plate wells were subjected to several washes with ice-cold saline buffer. Same procedures were performed with control. The total volume obtained by removing the supernatant and the washes was 10 ml. From this volume, 20 µl were plated in brain heart infusion (BHI – Oxoid, Waltham, MA, USA) agar to evaluate the fungal and bacterial growth and to calculate the microbicidal activity of monocytes. After 48 h, the colony forming units (CFU) were counted and the percentage (%) of microbicidal activity was calculated using the following formula:

$$\% \text{ microbicidal activity} = (1 - \text{CFU treated cultures} / \text{CFU control}) \times 100.$$

Hydrogen peroxide production

Dichlorofluorescein (DCF) was used as an indicator of the intracellular formation of reactive oxygen species. Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) crosses the cell membrane and is esterified by intracellular esterases within the cell, where it is susceptible to oxidation by hydrogen peroxide, leading to the formation of DCF – its fluorescent form. Human monocytes were plated at 1×10^6 cells/ml and incubated with medium alone (control), geopropolis, DOX and their combination. After 18 h, 5.3 mM de phorbol myristate acetate (PMA) was added for 15 minutes. Cells were harvested, centrifuged and washed with 1X PBS. DCF-DA (5 µM) was added for 45 minutes, the cells were washed with PBS and centrifuged, the supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended. DCF fluorescence intensity was analyzed at an excitation wavelength of 480 nm and fluorescence emission was measured in FL-1 channel at 530 nm using the FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer. 40000 events were recorded for each analysis.

Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism 5 software (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test were employed. Data were expressed as mean \pm standard deviation of 10 individuals and differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Cell viability

The viability of human monocytes after incubation with geopropolis and DOX alone or in combination (G + D) for 18 h was assessed by MTT assay, in the absence or presence of LPS. Treatments did not exert cytotoxic effects on monocytes and cell viability was $\geq 90\%$ (**Fig. 1**).

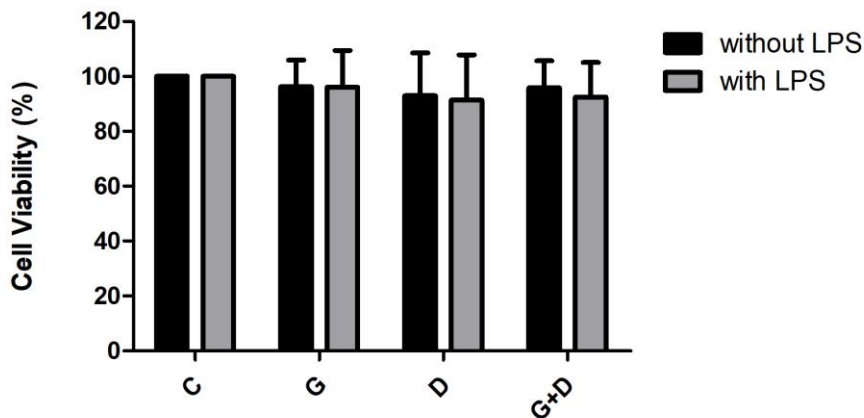


Figure 1. Viability (%) of human monocytes incubated with RPMI 1640 (control – C), geopropolis (G – 25 $\mu\text{g/ml}$), doxorubicin (D – 1 μM) or their combination (G + D) after 18 h, in the absence or presence of LPS (10 $\mu\text{g/ml}$). Data represent mean and standard-deviation (n = 10).

Expression of cell surface markers

Treatment of monocytes with geopropolis ($P < 0.01$) and its combination with DOX ($P < 0.05$) upregulated significantly TLR-4 expression compared to control. Geopropolis and DOX alone did not affect CD80 expression, whereas their combination increased its expression ($P < 0.05$). The expression of TLR-2, CD40 and HLA-DR was not altered by the treatments (**Fig. 2**).

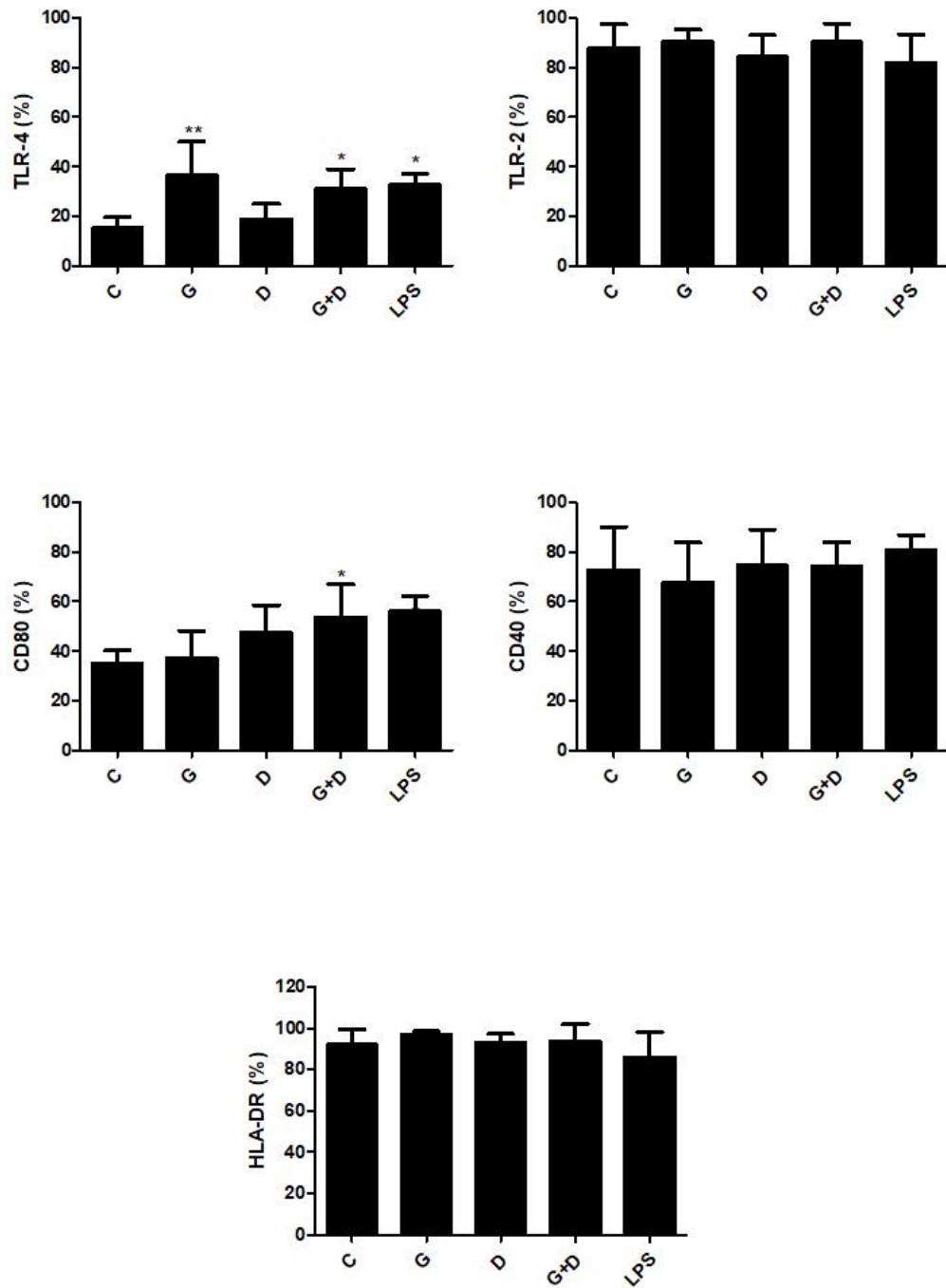


Figure 2. Percentage (%) of surface markers expression by human monocytes incubated with RPMI 1640 (control – C), geopropolis (G – 25 µg/ml), doxorubicin (D – 1 µM) or their combination (G + D) by 18 h. Data represent mean and standard deviation (n = 10). Significantly different from control: * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$).

Cytokine production

Monocytes were incubated with the treatments for 18 h in the presence or absence of LPS. TNF- α and IL-10 production was not detected when cells were incubated without LPS. In the presence of LPS, geopropolis and DOX alone significantly increased TNF- α and IL-10 production ($P < 0.001$). The combination induced a higher TNF- α production in comparison to the treatments alone ($P < 0.001$) and also stimulated IL-10 production ($P < 0.001$). (**Fig. 3**).

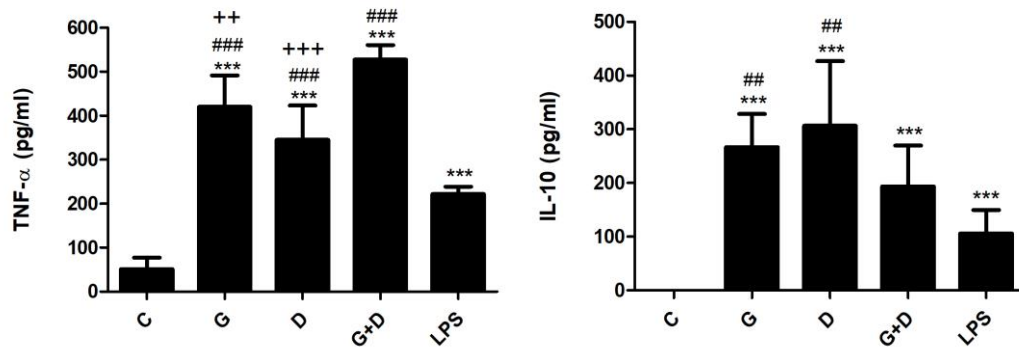


Figure 3. TNF- α and IL-10 production (pg/ml) by human monocytes incubated with RPMI 1640 (control – C), geopropolis (G – 25 μ g/ml), doxorubicin (D – 1 μ M) or their combination (G + D) after 18 h in the presence of LPS (10 μ g / ml). Data represent mean and standard-deviation (n = 10). Significantly different from control: *** ($P < 0.001$); significantly different from LPS: ## ($P < 0.01$) and ### ($P < 0.001$); significantly different from G + D: ++ ($P < 0.01$) and +++ ($P < 0.001$).

In the absence of LPS, geopropolis decreased IL-1 β production ($P < 0.05$), although DOX increased its production compared to control ($P < 0.001$). The combination maintained IL-1 β production similar to baseline levels (**Fig. 4A**). LPS-incubated cells did not show alterations in IL-1 β production (**Fig. 4B**). On the other hand, all treatments decreased IL-6 production in absence or presence of LPS (**Fig. 4C and 4D**).

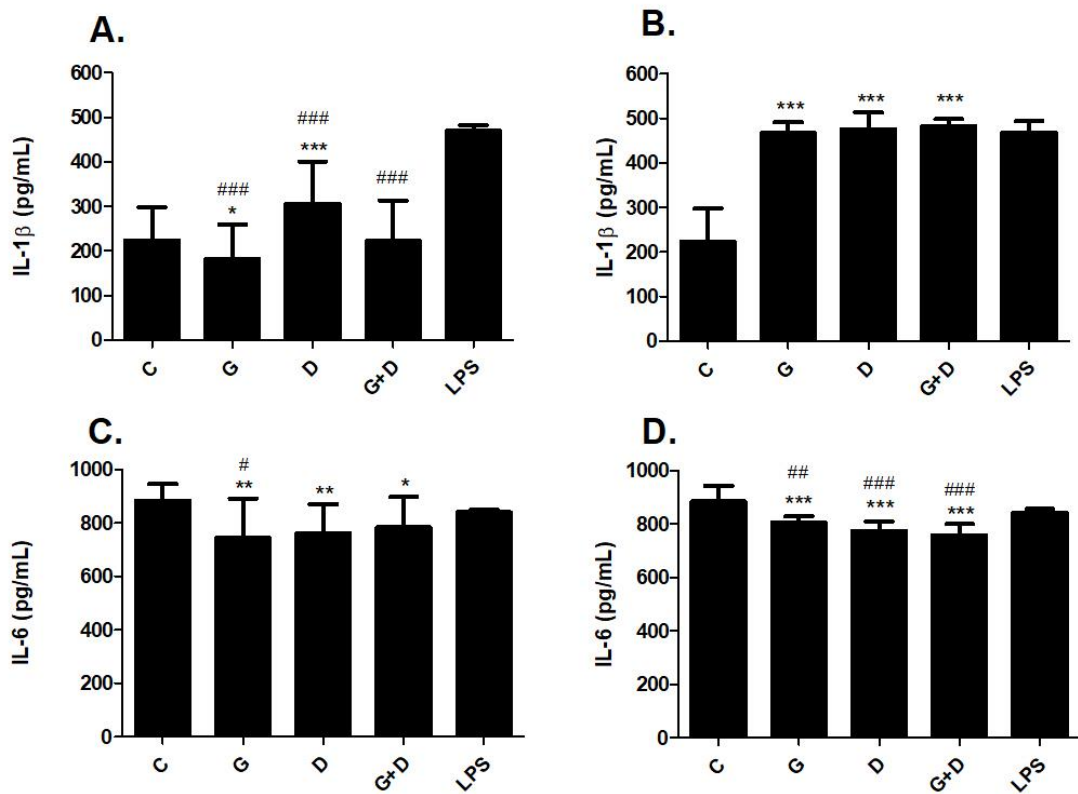


Figure 4. IL-1 β and IL-6 production (pg/ml) by human monocytes incubated with RPMI 1640 (control – C), geopropolis (G – 25 μ g/ml), doxorubicin (D – 1 μ M) or combination (G + D) after 18 h in the absence (A, C) or presence (B, D) of LPS (10 μ g / ml). Data represent mean and standard-deviation (n = 10). Significantly different from control: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) and *** ($P < 0.001$); significantly different from LPS: # ($P < 0.05$), ## ($P < 0.01$) and ### ($P < 0.001$).

Real-time PCR and Western blot for NF- κ B and autophagy

A non-significant decreased NF- κ B gene expression was seen when the cells were treated with geopropolis, DOX or their combination compared to control. LC3 expression was significantly inhibited by all treatments, and although DOX exerted an inhibitory effect it was higher than the combination. Western blot analysis revealed that the geopropolis decreased the phosphorylation of I κ B α , but doxorubicin and the association maintained similar levels compared to control (Fig. 5).

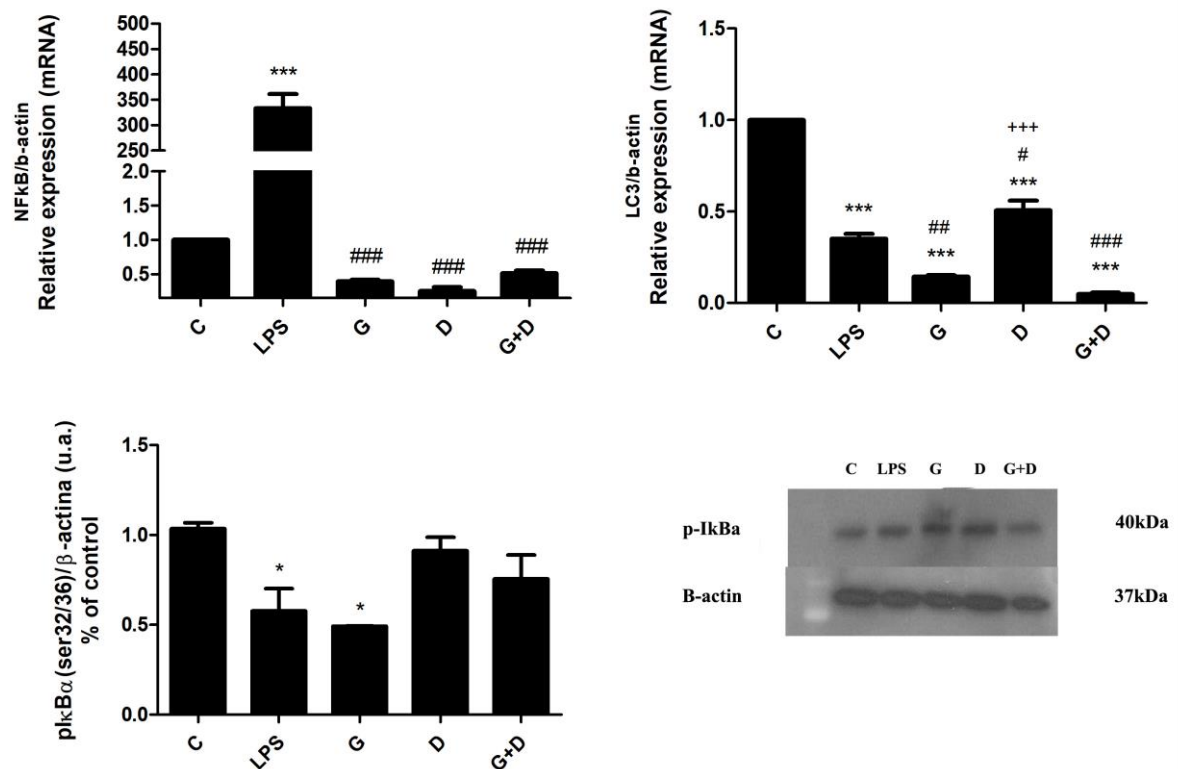


Figure 5. Relative gene expression of NF- κ B and LC3A/B, and protein expression of phospho-I κ B α by human monocytes incubated with RPMI 1640 (control – C), geopropolis (G – 25 μ g/ml), doxorubicin (D – 1 μ M), combination (G + D) or LPS (10 μ g/ml) after 18h. Data represent mean and standard-deviation (n = 10). Significantly different from control: * ($P < 0.05$), *** ($P < 0.001$); significantly different from LPS: # ($P < 0.05$), ## ($P < 0.01$) and ### ($P < 0.001$); significantly different from G + D: +++ ($P < 0.001$).

Microbicidal activity

The fungicidal activity of monocytes treated with geopropolis, DOX or G + D against *C. albicans* did not show significant differences, although a slight decrease was observed after incubation with DOX (**Fig. 6**).

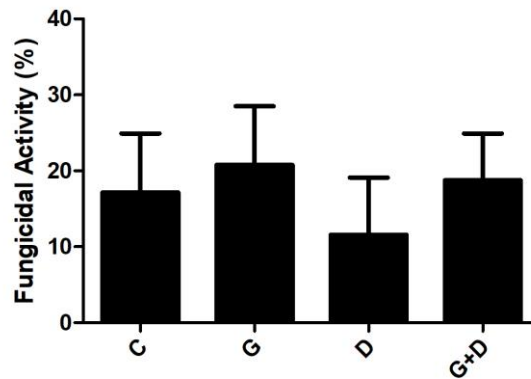


Figure 6. Fungicidal activity (%) of human monocytes incubated with RPMI 1640 (control – C), geopropolis (G – 25 µg/ml), doxorubicin (D – 1 µM) or their combination (G + D) for 18 h, and challenged with *C. albicans* (monocytes/fungi 1:5) for 2 h. Data represent mean and standard-deviation (n = 10).

Concerning the bactericidal activity, DOX significantly decreased the microbicidal activity of the human monocytes challenged with *E. coli*, but the addition of geopropolis prevented DOX action, increasing the bactericidal activity. There were no significant differences in the bactericidal activity against *S. mutans*, however a discreet increase may be observed when monocytes were treated with the combination (**Fig. 7**).

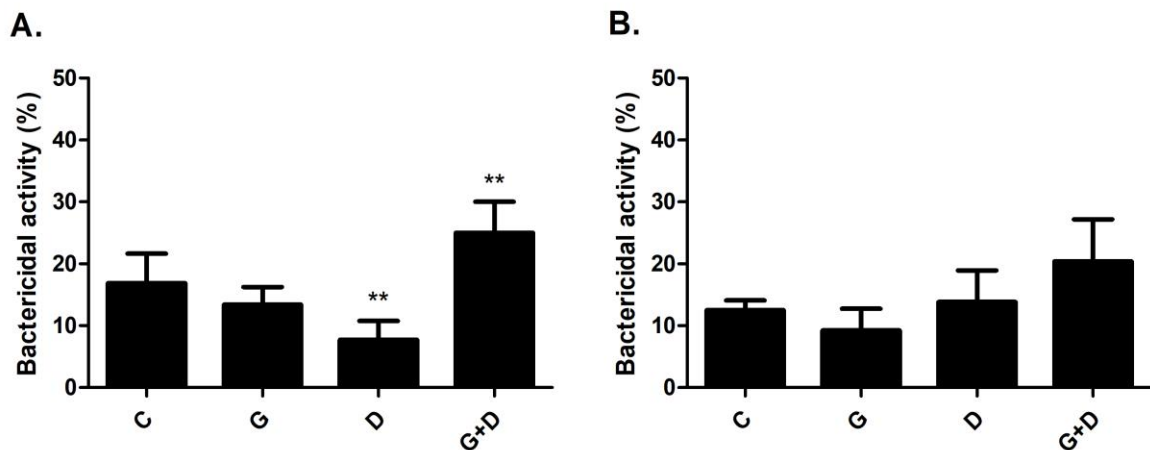


Figure 7. Bactericidal activity (%) of human monocytes incubated with RPMI 1640 (control – C), geopropolis (G – 25 µg/ml), doxorubicin (D – 1 µM) or combination (G + D) for 18 h, and challenged with *E. coli* (A) or *S. mutans* (B) (monocytes/bacteria 1:5) for 2 h. Data represent mean and standard-deviation (n = 10). Significantly different from control: ** ($P < 0.01$).

Hydrogen peroxide production

A mild reduction was seen in H_2O_2 production by geopropolis-treated monocytes, while DOX inhibited drastically its production comparing to the positive control (PMA). When monocytes were incubated with both geopropolis and DOX, the bee product prevented DOX action (**Fig. 8**).

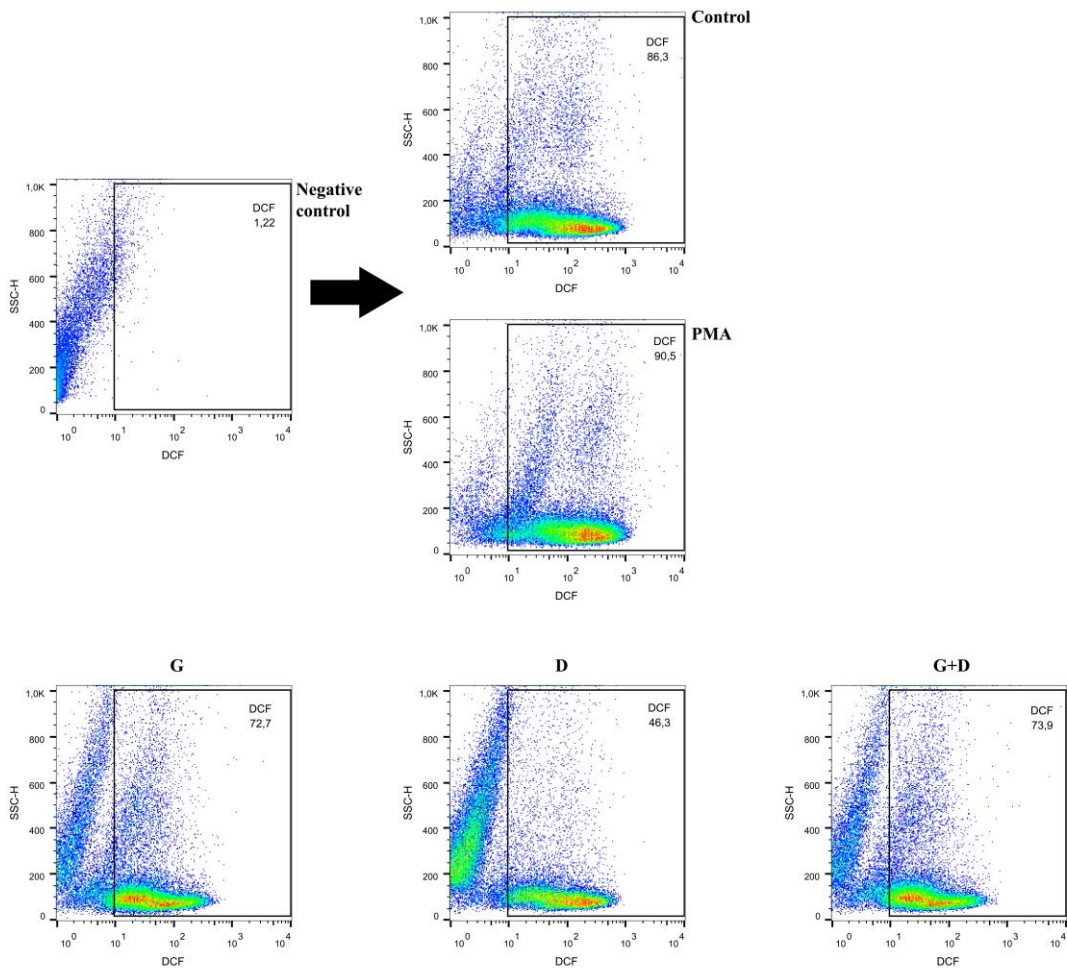


Figure 8. Representative dot plots of DCF+ labeled cells after incubation with RPMI 1640 (basal control), PMA (3 μ M / mL), geopropolis (G - 25 μ g/ml), doxorubicin (D - 1 μ M) or combination (G + D) for 18 h. The gate of DCF+ cells was delineated in negative control (autofluorescent).

DISCUSSION

Cancer leads to millions of deaths annually all around the globe and chemotherapeutic agents such as doxorubicin have been used for its treatment. The use of such drug entails some undesired side effects, such as monocytopenia, due to lack of selectivity between normal and

tumor cells. Our group has shown that geopropolis may potentiate the action of chemotherapeutic agents against HEP-2 cells⁸; however, it is not known whether this combination could affect monocytes, since chemotherapy is systemically distributed in the blood stream.

Propolis and geopropolis exhibited cytotoxic effects on tumor cells but not in immune cells from healthy donors (e.g. dendritic cells, monocytes).^{8, 9, 19-21} Santos *et al.* demonstrated that the hydroalcoholic extract of geopropolis (25 and 50 µg/ml) protected erythrocytes from oxidative lysis and presented an antioxidant action.²² Moreover, the combination of geopropolis or propolis with chemotherapeutic agents did not affect THP-1 cells and Vero cells as well.^{8, 20} The present study showed that the treatments did not affect the viability of human monocytes either in the absence or presence of LPS, allowing the continuity of this work.

The immune system is vital in protecting the body against infectious disease and cancers. Toll-like receptors (TLRs) are vital elements of the mammalian immune system that function by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), bridging innate and adaptive immunity. The main natural binding ligands of TLR-4 are lipopolysaccharides (LPS), major components of the Gram-negative bacteria cell membrane responsible for bacterial sepsis, lipoteichoic acid and the respiratory syncytial virus (RSV) F fusion protein. TLR2 is involved in the recognition PAMPs from a wide range of pathogens, including bacteria, viruses and fungi, such as peptidoglycan, lipoproteins of mycobacteria cell wall, lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria, among others.^{23,24}

A higher TLR expression is important during microbial infections, mainly in individuals with impaired immune system due to aggressive treatments such as chemotherapy.²⁴ The treatment with geopropolis and its combination with DOX upregulated TLR-4 expression and did not affect TLR-2 expression, suggesting that the combination may not affect the recognition of PAMPs by monocytes and subsequent activation of the adaptive immune response. Fricke *et al.* demonstrated that TLR-2 was the main pathway by which dendritic cells interacted with *Mycobacteria* spp, leading to IFN- γ production and consequent activation of cellular immunity.²⁵

Our treatments maintained HLA-DR expression, what is in agreement with previous works of our group using human monocytes or dendritic cells and propolis, suggesting that the treatments may preserve antigen presentation and promote an efficient immune response. A reduced HLA-DR expression may be associated with increased cortisol during stressful situations for the organism, such as complex surgeries and systemic infections, what may

compromise the individual's immune response. In addition, a decreased HLA-DR expression may be related to the development of non-Hodgkin's lymphoma. A decreased HLA-DR expression in biopsies of some patients was associated with a lower survival, even during chemotherapy. Patients who did not express HLA-DR exhibited a lower cytotoxic action against tumor cells and loss of antigen presentation capacity.²⁶⁻²⁹

With respect to the costimulatory molecules, CD80 was upregulated by the combination geopropolis/DOX. Bueno-Silva *et al.* obtained similar results evaluating murine macrophages incubated with red propolis and LPS. An increased CD80 expression and TNF- α production was seen compared to control, revealing the modulatory action of red propolis and suggesting its use as a bioactive food supplement.³⁰ On the other hand, Byun obtained opposite results using another natural product – the extract of *Schizonepeta tenuifolia*, popularly used for the treatment of common cold. Murine macrophages incubated with this extract in the presence of LPS showed a lower proinflammatory cytokines production (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and a lower CD80 and CD86 expression, evidencing the immunomodulatory/anti-inflammatory action.³¹ Based on these findings, different natural products can present different biological actions, depending on its chemical composition.

Our treatments did not affect CD40 expression, maintaining its baseline levels. CD40 is expressed by APCs during their interaction with T lymphocytes. The interaction of CD40-CD40L promotes the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules in cells of the immune system and cytotoxic response to virus infected cells or tumor cells.³²

In this work, geopropolis + DOX increased TLR-4 and CD80 expression, and maintained the high expression of TLR-2, CD40 and HLA-DR, showing that this combination may not impair antigen recognition and costimulatory molecules expression.

After activation, monocytes release cytokines as well as reactive oxygen and nitrogen species. Regarding cytokine production, Araújo *et al.* (2015) observed that geopropolis (25 $\mu\text{g/ml}$) increased both TNF- α and IL-10 production by human monocytes.⁹ Besides, a recent work of our group demonstrated that geopropolis also increased TNF- α production by THP-1 cells. Our findings are in agreement with these data.²⁰

TNF- α has plenty of biological functions, acting as the main mediator of inflammation, inducing the expression of adhesion molecules, and being a target for new treatments of inflammatory diseases and cancer. Concerning tumor cells, TNF- α can act on caspases pathway and affect cell cycle. Its interaction with TNFR1 and 2 promotes activation of caspase-8-mediated cell death, leads to cleavage the Bid protein in a truncated form, subsequently translocated to the mitochondria. This process induces alteration of

mitochondrial membrane potential and release of cytochrome C to the cytosol with consequent activation of the apoptotic complex, resulting in cell death.^{33,34}

IL-10 is known for its anti-inflammatory profile, inhibiting the synthesis of Th1 profile and cytokines production by NK cells, T cells, monocytes and macrophages. IL-10 is able to inhibit the expression of some cytokines (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6), soluble mediators (IL-8, IP-10, MIP-2) and cell surface markers, such as TLR-4. In addition, IL-10 increases the expression of CD64, CD14, CD16. IL-10 may also act as a promoter of B lymphocyte proliferation, activation and increase of NK cell proliferation and activation of cytotoxic T cells, demonstrating also pro-inflammatory actions.³⁵ In our study, although geopropolis and its combination with DOX increased IL-10 production, they also increased TLR-4 expression, suggesting a dual/differential activation of IL-10 and TLR-4 pathways by our treatments.

IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine crucial for the innate immune response, inducing the production of inflammatory mediators, such as nitric oxide and prostaglandin-E2, the expression of adhesion molecules in endothelial cells, and promoting the infiltration of immune cells from the circulation into the tissues.³⁶ Its production is associated to PAMPs: immune cells interact with these pathogen patterns and start the cleavage process transforming the inactive form pro-IL-1 β into IL-1 β , the active molecule.³⁷ This process occurs through inflammasome pathway, nod like-receptor (NLR) P3 dependent, and antigens need to be internalized in order to interact with NLRP3 and start the production and cleavage of a functional molecule of IL-1 β . Besides the inflammasome pathway, this cytokine may be secreted by the autophagy pathway. Immune cells treated with LPS recruit IL-1 β to autophagosomes, and when this pathway is blocked, this cytokine is secreted.³⁸ Since DOX-treated monocytes exhibited an increased IL-1 β production, it may reflect an inflammatory character of the chemotherapeutic agent.

IL-6 exerts both pro- and anti-inflammatory actions, and is involved in the metabolism homeostasis.³⁹ The production this cytokine is related to the activation of NF- κ B and AP-1 pathways, leading to this ambiguous profile. IL-6 production can be altered due to antigen interaction with TLRs or regenerative stimulus.⁴⁰ IL-10 can also act on the production of IL-6, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and mast cells treated with IL-10 had a decreased or even inhibited IL-6 production.³⁵ In our study, the combination geopropolis + DOX inhibited IL-6 production by monocytes, either due to its action on intracellular pathways or increasing IL-10 production.

Furthermore, an upregulated IL-6 production has been associated with tumor growth and chemotherapy resistance. Mice-chemically induced to develop hepatocellular carcinoma exhibited an increased IL-6 concentration and the tumor cells gained mutations in IL-6 related genes.⁴¹

Our data demonstrated that treatments altered cytokines production by human monocytes, suggesting that the combination geopropolis + DOX may act in different pathways of the immune response, since the production of TNF- α is related to the activation of the NF- κ B, IL-10 is under STAT3 control, IL-1 β is related to inflammasome or autophagy pathways, and IL-6 to NF- κ B and AP-1 pathways.^{38, 40, 42, 43} Thus, two possible targets were further analysed: NF- κ B pathway and autophagy.

With respect to NF- κ B pathway, monocytes expressed low levels of NF- κ B and phosphorylated I κ B α and high production of TNF- α , suggesting a different activation pathway for this cytokine production, such as MAPK pathway⁴⁴ or high proteasoma activity.⁴⁵ Besides its action on cytokines production, NF- κ B pathway may be associated with DOX side effects such as cardiotoxicity. Zhang et al. treated H9c2 cells, a cardiomyocyte cell line, with DOX and evaluated the activation of NF- κ B pathway. DOX induced apoptosis in H9c2 cells, but a decrease in cell death was observed in knockout cells, what indicated that the activation of NF- κ B pathway is necessary for the cardiomyocyte death.⁴⁶ Therefore, the maintainance of NF- κ B pathway in doxorubicin-treated monocytes herein may be related to the absence of cytotoxicity.

DOX, geopropolis and their combination downregulated LC3 expression; however, DOX was less efficient to inhibit LC3 gene expression and increased IL-1 β production comparing to the combination, suggesting that autophagy pathway was not associated with high levels of IL-1 β . One may speculate that the inflammasome pathway could be involved in this cytokine production.⁴⁷ Autophagy also plays an important role in DOX-caused side effects. The incubation of H9c2 cell line with DOX led to an increase in autophagy and consequently cell death, but the addition of ghrelin decreased the induction of autophagy and apoptosis of cardiomyocytes, what indicated that this hormone was able to decrease one of the side effects of DOX, upregulating mTOR pathway and inhibiting autophagosome formation.⁴⁸ Tacar and Dass reported the role of autophagy in the treatment with DOX, pointing out that the increased autophagy may be beneficial for the good prognosis of cancer patients, since this pathway is responsible for destroying damaged organelles and inducing tumor cell death.⁴⁹ Although LC3 expression was affected in doxorubicin-treated monocytes, the cell

viability was not affected by DOX. Moreover, the combination strongly inhibited LC3 expression demonstrating a protective effect of this combination.

The ability of monocytes to recognize pathogens is one of the first defenses against invading microorganisms. The phagocytic activity of human monocytes was evaluated against *C. albicans*, *E. coli* and *S. mutans*. Regarding the fungicidal activity, there were no significant differences after incubation of monocytes with the treatments and challenge with *C. albicans*, although a decreased fungicidal activity may be observed in DOX-treated monocytes. The microbicidal activity of monocytes after treatment with natural products has been investigated. Possamai *et al.* evaluated the phagocytic activity of blood mononuclear cells treated with microspheres containing propolis produced by Meliponinae bees, demonstrating that the use of microspheres was efficient in inducing phagocytosis and superoxide anion production in response to *C. albicans*.⁵⁰ Cardoso *et al.* reported that propolis-treated monocytes exhibited an increased fungicidal activity against *C. albicans*. In addition, propolis increased H₂O₂ production by monocytes, what may be related to the mechanisms responsible for fungus destruction.⁵¹ Halder *et al.* demonstrated that monocytes spontaneously respond to *C. albicans* cells via phagocytosis, decondensation of nuclear DNA and release of DNA in the form of monocytic extracellular traps called “MoETs”.⁵²

Previous studies have already demonstrated the antibacterial activity of geopropolis directly on bacterial strains in vitro. Araújo *et al.* (2015) demonstrated that geopropolis alone exerted no activity against *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but the combination of geopropolis with chloramphenicol displayed a higher activity than the antibiotic alone, evidencing a synergistic effect.⁹ Our findings showed a synergistic action of doxorubicin with geopropolis in monocytes challenged with *E. coli* what is interesting because it could help to combat one of the most common bacterial infections among patients who are undergoing chemotherapy.⁵³

Propolis action against oral bacteria has been investigated, especially *S. mutans*. Here, no significant differences were seen in the bactericidal activity against *S. mutans*, although a mild increase may be observed when monocytes were treated with the combination. Santiago *et al.* evaluated the microbicidal activity of propolis-treated monocytes against *S. mutans*, demonstrating that propolis significantly increased the bactericidal activity of these cells.⁵⁴ Conti and colleagues verified that propolis increased the bactericidal activity of dendritic cells against *S. mutans*.²⁹

The production of reactive oxygen species may be one of the mechanisms involved in the microbicidal activity of immune cells. DOX diminished H₂O₂ production by monocytes,

while geopropolis and the combination did not affect it. Decreased levels of reactive oxygen species may be related to lower bactericidal and fungicidal activities of doxorubicin-treated monocytes. The action of geopropolis in H₂O₂ production is unknown but the action of propolis produced by Africanized honeybees is already known. Studies have shown an increased H₂O₂ production by murine propolis-treated macrophages.⁵⁵ Recently, our group demonstrated that propolis and some of its components alone or in combination (caffeic and cinnamic acid) were able to induce a significant increase in H₂O₂ production by monocytes, suggesting that propolis action may be due to a synergistic effect of various components.⁵² Similarly to propolis, geopropolis has a complex composition and a possible synergistic action may affect monocytes functions.

Taking together, data showed that the combination geopropolis + DOX was not cytotoxic to human monocytes and exerted immunomodulatory effects, favoring the production of TNF- α and IL-10, diminishing the IL-6 production and increasing the expression of TLR-4 and CD80. On the other hand, the combination decreased the expression of NF- κ B and LC3. While DOX altered some parameters, the addition of geopropolis maintained these parameters to the baseline status, as observed for IL-1 β production and the microbicidal assay. Thus, this combination displays immunomodulatory effects without affecting the viability of immune cells, and could reduce the concentration of DOX and its side effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for the grant (FAPESP - 2016/02249-4).

DISCLOSURES

The authors declare that they have no conflicts of interests.

REFERENCES

- [1] American Cancer Society Cancer Statistics Center <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/> accessed in 02/09/17
- [2] Kim JH, Monsel A, Bertrand M, Coriat P, Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Gamma irradiation reduces the immunological toxicity of doxorubicin anticancer drug *Rad Phys Chem* 2009; 78:425-28
- [3] Onyema OO, Decoster L, Njemini R, Forti LN, Bautmans I, De Waele M, Mets T. Shifts in subsets of CD8+ T-cells as evidence of immune senescence in patients with cancers affecting the lungs: an observational case control study *BMC Cancer* 2015; 15:1-11
- [4] Nazir T, Taha N, Islam A, Abraham S, Mahmood A, Mustafa M. Monocytopenia, Induction by Vinorelbine Cisplatin and Doxorubicin in Breast Non-Small Cell Lung and Cervix Cancer Patients *Int J Health Sci* 2016; 10:542-547
- [5] Jakubzick CV. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:349-362
- [6] Weinstock A, Pevsner-Fischer M, Porat Z, Selitrennik M, Zipori D. Cultured mesenchymal stem cells stimulate an immune response by providing immune cells with Toll-Like receptor 2 ligand. *Stem Cell Rev* 2015; 11:826-840
- [7] Sepehri Z, Kiani Z, Kohan F, Alavian SM, Ghavami S. Toll like receptor 4 and hepatocellular carcinoma; A systematic review. *Life Sci* 2017; 179:80-87
- [8] Bartolomeu AR, Frión-Herrera Y, Da Silva Lm, Romagnolli GG, De Oliveira DE, Sforcin JM. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomed Pharmacother* 2016; 81:48-55
- [9] Araújo MJAM, Búfalo MC, Conti BJ, Fernandes Jr A, Trusheva B, Bankova V, Sforcin JM The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *J Mol Pathophysiol* 2015; 4:12-20
- [10] Cinegaglia NC, Bersano PRO, Araújo MJAM, Búfalo MC, Sforcin JM. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells *in vitro*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013:1-6
- [11] Libério SA, Pereira ALA, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJAM, Mattar NS, Silva LA, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Guerra RNM, Monteiro-Neto V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Complement Altern Med* 2011; 11:1-7
- [12] Duran N, Allahverdiyev AM, Çetiner A. Flow cytometric analysis of the effects of methotrexate and vespil on the HEp-2 cell cycle. *Turk J Med Sci* 2001; 31:187-192
- [13] Harbottle A, Daly AK, Atherton K, Campbell FC. Role of glutathione S-transferase P1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *Int J Cancer* 2001; 92:777-783
- [14] Hwang H, Biswas R, Chung PS, Ahn JC. Modulation of EGFR and ROS induced cytochrome c release by combination of photodynamic therapy and carboplatin in human

- cultured head and neck cancer cells and tumor xenograft in nude mice. *J Photochem Photobiol B Biol* 2013; 128:70-77
- [15] Schuler PJ, Trellakis S, Greve J, Bas M, Bergmann C, Bölke E, Lehnerdt G, Mattheis S, Albers AE, Brandau S, Lang S, Whiteside TL, Bier H, Hoffmann TK. *In vitro* chemosensitivity of head and neck cancer cell lines. *Eur J Med Res* 2010; 15:337-344
- [16] Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRO, Costa MCP, Ribeiro MNS. Pharmacognostic evaluation of geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith from Baixada maranhense. *Rev Bras Farmacogn* 2008; 18:557-562.
- [17] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
- [18] Sforcin JM, Novelli ELB, Funari SRC. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. *J Venom Anim Toxins* 2002; 8:224-254.
- [19] Conti BJ, Búfalo MC, Golim MA, Bankova V, Sforcin JM. Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013:1-7.
- [20] Oliveira LPG, Conte FL, Cardoso EO, Conti BJ, Santiago KB, Golim MA, Cruz MT, Sforcin JM. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. *J Pharm Pharmacol* 2016; 68:1551-1558.
- [21] He G, He G, Zhou R, Pi Z, Zhu T, Jiang L, Xie Y Enhancement of cisplatin-induced colon cancer cells apoptosis by shikonin a natural inducer of ROS *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 469:1075-1082.
- [22] Santos HF, Campos JF, Santos CM, Balesieri JBP, Silva DB, Carollo CA, Souza KP, Estevinho LM, Santos EL. Chemical profile and antioxidant anti-inflammatory antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *Int J Mol Sci* 2017; 18:1-18.
- [23] Ignacio BJ, Albin T, Esser-Kahn AP, Verdoes M. TLR Agonist conjugation: A chemical perspective. *Bioconjug Chem* 2018; 2018:1-20.
- [24] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunol* 2005; 17:1-14.
- [25] Fricke I, Mitchell D, Mittelstadt J, Lehan N, Heine H, Goldmann T, Bohle A, Brandau S. Mycobacteria induce IFN- γ production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* 2006; 176:5173-5182.
- [26] Kim OY, Monsel A, Bertrand M, Coriat P, Cavaillon Jm, Adib-Conquy M. Differential down-regulation of HLA-DR on monocytes subpopulations during systemic inflammation. *Crit Care* 2010; 14:1-12.
- [27] Higashi M, Tokuhira M, Fujino S, Yamashita T, Abe K, Arai E, Kizaki M, Tamarau J. Loss of HLA-DR expression is related to tumor microenvironment and predicts adverse outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 2015; 2015:1-6.
- [28] Búfalo MC, Bordon-Graciana AP, Conti BJ, Golim MA, Sforcin JM. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J Pharm Pharmacol* 2014; 66:1497-1504.

- [29] Conti BJ, Santiago KB, Cardoso EO, Freire PP, Carvalho RF, Golim MA, Sforcin JM. Propolis modulates miRNAs involved in TLR4 pathway NF- κ B activation cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. *J Pharm Pharmacol* 2016; 68:1604-12.
- [30] Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Alencar SM, Rosalen PL, Mayer MPA. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in LPS-activated macrophages. *PLoS One* 2015; 10:1-14.
- [31] Byum MW. *Schizonepeta tenuifolia* ethanol extract exerts anti-inflammatory activity through the inhibition of TLR4 signaling in lipopolysaccharide-stimulated macrophage cells. *J Med Food* 2014; 17:350-56.
- [32] Elgueta R, Benson MJ, Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009; 229:1-31.
- [33] Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843:2563-82.
- [34] Macewan DJ. TNF receptor subtype signaling: differences and cellular consequences *Cell Signal* 2002; 14:477-492
- [35] Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
- [36] Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2010; 27:519-50.
- [37] Guo H, Callaway JB, Ting JPY. Inflammasomes: mechanism of action role in disease and therapeutics. *Nat Med* 2015; 21:677-87.
- [38] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22:189-95.
- [39] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and antiinflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813:878-88.
- [40] Hungness ES, Pritts TA, Luo GJ, Sun X, Penner CG, Hasselgren PO. The transcription factor activator protein-1 is activated and interleukin-6 production is increased in interleukin-1 beta-stimulated human enterocytes. *Shock* 2000; 14:386-91.
- [41] Mauer J, Denson JL, Brüning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol* 2015; 36:92-101.
- [42] Iyer S, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 2012; 32:23-63.
- [43] Mitchell S, Vargas J, Hoffman A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2016; 8:227-41.
- [44] Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci* 2005, 77:1502-15.
- [45] Wong E, Cuervo AM. Integration of clearance mechanisms: The proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2:1-19.

- [46] Zhang DX, Ma DY, Yao ZQ, Fu CY, Shi YX, Wang QL, Tang QQ. ERK1/2/p53 and NF- κ B dependent-PUMA activation involves in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20:2435-42.
- [47] Molino D, Zemirli N, Codogno P, Morel E. The journey of the autophagosome through mammalian cell organelles and membranes. *J Mol Biol* 2017; 429:497-514.
- [48] Wang X, Wang XL, Chen HL, Wu D, Chen JC, Wang XX, Li RL, He JH, Mo L, Cen X, Wei YQ, Jiang W. Ghrelin inhibits doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting excessive autophagy through AMPK and p38-MAPK. *Biochem Pharmacol* 2014; 88:334-50.
- [49] Tacar O, Dass CR. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes? *J Pharm Pharmacol* 2013; 65:1577-89.
- [50] Possamai MM, Honorio-França AC, Reinaque APB, França EL, Souto PCS. Brazilian propolis: a natural product that improved the fungicidal activity by blood phagocytes. *BioMed Res Int* 2013; 2013:1-9.
- [51] Cardoso EO, Conti BJ, Santiago KB, Conte FL, Oliveira LPG, Hernandez RT, Golim MA, Sforcin JM. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. *J Pharm Pharmacol* 2017; 69:99-108.
- [52] Halder LD, Abdelfatah MA, Jo EAH, Jacobsen ID, Westermann M, Beyersdorf N, Lorkowski S, Zipfel PF, Skerka, C. Factor H binds to extracellular DNA traps released from human blood monocytes in response to *Candida albicans*. *Front Immunol* 2017; 7:1-14.
- [53] Baden LR, Bensinger W, Angarone M, Casper C, Dubberke ER, Freifeld AG, Garzon R, Greene JN, Greer JP, Ito JI, Karp JE, Kaul DR, King E, Mackler E, Marr KA, Montoya JG, Morris-Engemann A, Pappas PG, Rolston K, Segal B, Seo SK, Swaminathan S, Naganuma M, Shead DA. Prevention and treatment of cancer-related infections. *J Natl Compr Cancer Netw* 2012; 10:1412-45.
- [54] Santiago KB, Conti BJ, Cardoso EO, Golim MA, Sforcin JM. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. *Pathog Dis* 2016; 74:1-20.
- [55] Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Animal Toxins* 2000; 6:205-19.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012 – Doadores Saudáveis

CONVIDO, o(a) Senhor(a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “POSSÍVEL AÇÃO CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DA GEOPRÓPOLIS ASSOCIADA À DOXORRUBICINA SOBRE MONÓCITOS HUMANOS”, que será desenvolvido por mim, Lucas Pires Garcia Oliveira, sob orientação do Professor José Maurício Sforcin, do Instituto de Biociências (UNESP - Botucatu).

Sua participação nesta pesquisa se dará por ser uma pessoa saudável, sem nenhum tipo de doença. Estou estudando os efeitos da geoprópolis associada a um produto quimioterápico (doxorrubicina) sobre determinadas células do sistema imunológico (monócitos).

Para que eu possa obter estas células, preciso coletar 20 mL do seu sangue. O(a) senhor(a) não será tratado com a geoprópolis ou com o produto quimioterápico, apenas as suas células que forem retiradas.

Para se incluir no estudo, os doadores deverão ser maiores de 18 anos, saudáveis, não fumantes, que não possuam vínculo com a UNESP, que não tenham ingerido bebidas alcoólicas na noite anterior, que não estejam tomando anti-inflamatórios ou outros medicamentos imunomoduladores.

Para a exclusão de doadores, ser menores de 18 anos, não saudáveis, fumantes, que possuam vínculo com a UNESP, que tenham ingerido bebidas alcoólicas na noite anterior, que estejam tomando anti-inflamatórios ou outros medicamentos imunomoduladores.

Os riscos para o(a) senhor(a) implicam em uma picada de agulha para retirada do sangue o que pode ser dolorido, e o lugar da picada pode ficar roxo e sensível. O(A) senhor(a) não terá nenhum benefício direto porém, a doação do sangue permitirá a realização de uma pesquisa que no futuro possa melhorar a qualidade de vida de pessoas com câncer e que passam pelo tratamento quimioterápico.

O material biológico que coletaremos do(a) senhor(a) será utilizado em sua totalidade, não restando material para ser utilizado em outro projeto de pesquisa.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que, mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador: Lucas Pires Garcia Oliveira
Depto. de Microbiologia e Imunologia
IB - UNESP - Campus Botucatu
(14) 3880 0425
pires081@hotmail.com

Participante da Pesquisa

Orientador: Prof. Adj. José Maurício Sforcin
(14) 3880 0445
sforcin@ibb.unesp.br