

**AÇÃO SINÉRGICA DE COMPONENTES DA PRÓPOLIS
SOBRE PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ATIVIDADE
BACTERICIDA DE MONÓCITOS HUMANOS**

ELIZA DE OLIVEIRA CARDOSO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que lutam por uma educação científica e cultural cujo objetivo seja a real humanização do indivíduo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Sforcin, por todo o conhecimento e sabedoria; pela paciência, pela confiança, pela gentil e fiel amizade. Obrigada por renovar, a cada dia, minha sede por conhecimento (tanto científico quanto filosófico). Não há palavras suficientes para expressar minha gratidão e admiração pela pessoa que és.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez, pela grande ajuda, paciência, debates, risadas e amizade.

Aos colegas de laboratório Bruno e Karina, pelo auxílio e ensinamentos essenciais para a execução deste trabalho. Obrigada pelas conversas, risadas e puxões de orelha e amizade.

Aos colegas de laboratório Abigail, Ariane, Bruna, Gilce, Livia, Pedro e Yahima, pelo companheirismo, sorrisos e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos ensinamentos e discussões em volta da mesa de reunião ou de café. Agradecimento especial aos professores Ary, Sandra e Vera pela divertida e sincera amizade.

Aos meus pais, por terem se sacrificado imensamente para que eu pudesse concluir meus estudos, e por acreditarem em mim até quando eu mesma já não acreditava.

Aos meus amigos Ana Liz, Andrei, Bia, Juliana, Marina, Marcelo e Nina por terem sido os melhores amigos durante os anos de graduação. Que nossa amizade se mantenha alegre e respeitosa.

Às amigas Bárbara, Gabriela, Izabela, Priscila Tunes e Rafaela pelas risadas e conselhos durante os momentos de crise. Que nossa amizade se redescubra sempre.

Às amigas Priscila Orsini e Michele, pelas (altas) risadas em casa.

Às queridas Ana Maria, Camila, Fernanda, Katiane, Marília e Raquel, pela amizade quase recém-descoberta, porém tão importante quanto aquelas de longos anos de duração. Que nossas vidas se reencontrem sempre.

Aos amigos do Centro Acadêmico V de Junho, pela amizade, confiança, conhecimento e reconhecimento. Pela motivação em lutar por uma ciência socialmente justa, com o objetivo de retornar à população todo o investimento feito em mim.

Aos grandes amigos e melhores companhias de show: Aira, Camila Camargo, Camilla Guerra, Gabriela, Gustavo, Hiago, Jéssica, Juliana, Maria Vitória, Mariana, Paula e Wesley. Obrigada por todas as loucuras, cantorias, ouvidos e conselhos. Que sorte a minha ter vocês como amigos!

Aos professores do Instituto de Biociências de Botucatu, pelas aulas, ensinamentos e debates.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de iniciação científica concedida para execução deste projeto.

“Privatizaram sua vida, seu trabalho, sua hora de amar e seu direito de pensar. É da empresa privada o seu passo em frente, seu pão e seu salário. E agora, não contentes, querem privatizar o conhecimento, a sabedoria, o pensamento, que só à humanidade pertencem.”

(Bertolt Brecht)

RESUMO

CARDOSO, Eliza de Oliveira. **Ação sinérgica de componentes da própolis sobre produção de citocinas e atividade bactericida de monócitos humanos.**

Orientador: José Maurício Sforcin.

A própolis é um produto natural que apresenta diversas propriedades biológicas. Esse apiterápico possui complexa composição química, que pode variar de acordo com as diferentes fontes botânicas utilizadas pelas abelhas. Nas últimas décadas, os grupos de pesquisa procuraram compreender a atividade de seus componentes, a fim de investigar seu envolvimento na ação da própolis. No entanto, há poucos estudos sobre o possível sinergismo de seus componentes no sistema imunológico. Assim, este trabalho buscou investigar se os efeitos imunomoduladores da própolis em monócitos humanos são devidos à interação entre três ácidos fenólicos (ácidos cafeico, dihidrocinâmico e *p*-cumárico). Para tal, monócitos humanos foram obtidos de 10 doadores saudáveis e incubados com os componentes isolados e suas combinações (cafeico+dihidrocinâmico; cafeico+*p*-cumárico; dihidrocinâmico+*p*-cumárico; e cafeico+dihidrocinâmico+*p*-cumárico) de acordo com suas concentrações na composição da própolis, em ausência ou presença de LPS, por 18h. O possível efeito citotóxico foi avaliado após este período, pelo método colorimétrico de MTT. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α e IL-10) foi quantificada por ELISA. Para avaliar a atividade bactericida, as células foram incubadas com os componentes e, posteriormente, desafiadas com *Escherichia coli*. A porcentagem de atividade bactericida foi calculada e as diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Dunnett ($P < 0,05$). Em ausência de LPS, a própolis e as combinações entre seus ácidos estimularam a produção de citocinas. Em presença do estímulo inflamatório, a produção de citocinas induzida pelo LPS foi mantida pela própolis e pelas associações. O ácido dihidrocinâmico isolado aumentou a produção de IL-10 e a atividade bactericida dos monócitos, sem afetar a viabilidade celular. Estes resultados preliminares sugerem que os componentes estudados podem estar envolvidos na ação imunomoduladora da própolis, porém mais estudos sobre a possível interação entre os componentes do produto apícola são necessários.

Palavras-chave: própolis, ácidos fenólicos, citocinas, atividade bactericida, monócitos

ABSTRACT

CARDOSO, Eliza de Oliveira. **Synergistic action of propolis componentes on cytokines production and bactericidal activity of human monocytes.** Advisor: José Maurício Sforcin.

Propolis is a natural product with several biological properties. It shows a very complex chemical composition, what may change according to the botanical sources. In the last decades researchers have focused on the activity of its components, in order to investigate their involvement in propolis action. However, little is known concerning the synergism of its constituents on the immune system. Thus, this work aimed to investigate whether the immunomodulatory effects of propolis on human monocytes are due to the interaction between three phenolic acids (caffeic, dihydrocinnamic and *p*-coumaric acid). Human monocytes were obtained from 10 healthy donors and incubated with such components and their combinations (cafeic+dihydrocinnamic; caffeic+*p*-coumaric; dihydrocinnamic+*p*-coumaric; and caffeic+dihydrocinnamic+*p*-coumaric) according to their concentrations in propolis composition, simultaneously or not with LPS. A possible cytotoxicity was assessed by the colorimetric MTT assay. After 18h incubation, supernatants were collected and the production of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-10) was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To evaluate the bactericidal activity, monocytes were incubated with components and challenged with *Escherichia coli*, and the percentage of bactericidal activity was calculated. Significant differences between treatments were determined by analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test ($P < 0.05$). Without LPS, propolis and the associations between its acids stimulated the cytokines production. With inflammatory stimulus, the LPS-induce TNF- α and IL-10 production was maintained by propolis, its acids and their associations. Cinnamic acid increased IL-10 production and the bactericidal activity of monocytes, without affecting cell viability. These preliminary results suggest that these compounds may be involved in the immunomodulatory action of propolis, but further studies on the possible interaction of propolis compounds are still necessary.

Keywords: propolis, phenolic acids, cytokines, bactericidal activity, human monocytes

Introdução

I. Própolis e suas atividades biológicas

Com grande diversidade de componentes presentes em sua constituição, a própolis apresenta potenciais atividades biológicas que são alvos de importantes estudos científicos. A própolis *in natura* apresenta em sua composição cerca de 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos aromáticos e essenciais, e 5% de pólen e outras substâncias (BURDOCK, 1998). Este material é assim caracterizado devido à coleta de exsudatos e resinas dos ápices vegetativos (brotos e folhas jovens) de diferentes plantas e da mistura destas substâncias com cera e secreção das glândulas da abelha. Possui odor e cores características que variam entre vermelho, verde e marrom escuro. Sua composição química é complexa, podendo apresentar mais de 300 componentes pertencentes às classes dos flavonoides, ácidos aromáticos, óleos essenciais, di- e triterpenos, entre outros, que variam de acordo com a localização geográfica das plantas utilizadas pelos insetos (BANKOVA *et al.*, 1998). Seus componentes, tais como os óleos essenciais, bálsamos, compostos fenólicos e outros, podem ser extraídos a partir da utilização de solventes como éter, acetona, etanol, água, tolueno e tricloroetileno (CUNHA *et al.*, 2004).

Devido às poucas flutuações climáticas brasileiras, a coleta de material vegetal pelas abelhas acontece durante todo ano, enquanto que no hemisfério norte essa coleta acontece durante o verão. Em amostras coletadas em nosso apiário localizado na Fazenda Lageado (UNESP, Campus de Botucatu), verificamos que não houve diferença significativa entre a concentração de compostos biologicamente ativos presentes nas amostras coletadas durante as quatro estações sazonais (primavera, verão, outono e inverno). Estes dados indicam que as abelhas coletam materiais das mesmas fontes botânicas, sendo as três principais: *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo), seguida de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze e *Eucalyptus citriodora* Hook (BOUDOUROVA-KRASTEVA *et al.*, 1997; SFORCIN, 2007; BANKOVA *et al.*, 1999). Seus principais constituintes químicos foram identificados por cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia em camada delgada (TLC), sendo eles: flavonoides (4'-O-metil canferol, 5, 6, 7-trihidroxi-3,4' dimetoxiflavona, aromadendrina-4'-metil éter),

presentes em pequenas quantidade, ácido *p*-cumárico prenilado e dois benzopiranos: *E* e *Z* 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-benzopiranos; óleos essenciais (benzoato de benzila, acetofenonas preniladas, espatulenol, (2*Z*,6*E*)-farnesol); ácidos aromáticos (ácido dihidrocinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico, 2,2-dimetil-6-carboxi-etenil-2H-1-benzo-pirano) (BANKOVA *et al.*, 1998).

A própolis tem sido utilizada há milhares de anos pelo ser humano, para o tratamento de feridas de guerra e para a mumificação de corpos. A origem etimológica da palavra própolis vem do grego *-pro*, referente a defesa, e *-polis*, referente a cidade, e remete-se à função que o material produzido pelas abelhas desempenha nas colmeias. Nestes locais, a própolis é utilizada para vedação, controlando a entrada de água e ar, além de ser utilizada também para embalsamar cadáveres de pequenos animais que morrem dentro da colmeia, impedindo a ação de microorganismos na decomposição e mantendo a assepsia do local. Durante anos, nosso laboratório tem avaliado as atividades imunomoduladora, antimicrobiana e tumoral da própolis, impulsionando as pesquisas sobre o produto apícola (SFORCIN, 2007). Os resultados obtidos em nossas pesquisas corroboram os dados da literatura pertinente, indicando a ausência de efeitos colaterais após a administração a curto ou longo prazo em ratos. No que confere ao seu potencial antimicrobiano, nossos resultados mostraram o potencial antimicrobiano da própolis em testes *in vitro*, nos quais o apiterápico inibiu de modo eficiente o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, e apresentou limitada ação sobre as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SFORCIN *et al.*, 2000). Alguns estudos sugerem que essa atividade pode estar associada à principal fonte botânica de nossa amostra de própolis, visto que os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* também apresentaram ação bacteriostática sobre as mesmas bactérias (FERRONATO *et al.*, 2007). Nosso laboratório também revelou as atividades antiprotozoária sobre *Giardia duodenalis*, antifúngica sobre *Candida tropicalis* e *C. albicans*, e sobre a replicação do poliovírus tipo 1 em células HEP-2 (SFORCIN *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2006; BÚFALO *et al.*, 2009a; BÚFALO *et al.*, 2009b). A atividade antimicrobiana da própolis também foi confirmada pelo estudo de Koo *et al.* (2000) que comparou os efeitos do apiterápico com aqueles de *Arnica*

montana, evidenciando que a própolis inibiu o crescimento dos microorganismos testados, apresentando melhores resultados do que a *A. montana*.

A respeito da modulação da resposta imune contra microorganismos, estudos realizados em nosso laboratório revelaram que a própolis estimulou a atividade fungicida de macrófagos contra *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD *et al.*, 2002) e a atividade bactericida contra *Salmonella Typhimurium*, envolvendo a participação de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio (ORSI *et al.*, 2005). A própolis induziu a produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de receptores TLR2 e TLR4 (ORSI *et al.*, 2000; ORSATTI *et al.*, 2010). Estes efeitos da própolis podem ocorrer devido a ação de alguns componentes presentes em sua constituição, como indicam os dados de Missima *et al.* (2007), ao demonstrarem que extratos de *B. dracunculifolia* e alguns de seus compostos isolados, tais como friedelanol e óxido de *Baccharis*, estimularam macrófagos a produzirem maior quantidade de H₂O₂. Esta maior produção de H₂O₂ também foi verificada em macrófagos peritoneais de animais submetidos a estresse, além da recuperação dos níveis de IL-4 e da expressão de TLR4 que estavam inibidos nesses animais, demonstrando que a própolis pode ser utilizada como possível alternativa à imunossupressão verificada durante o estresse (MISSIMA & SFORCIN, 2008; PAGLIARONE *et al.*, 2009a; PAGLIARONE *et al.*, 2009b).

No que concerne à imunidade adaptativa, o tratamento com própolis estimulou maior produção de anticorpos em ratos, porém sem efeitos de compostos isolados ou de extrato de *B. dracunculifolia* (SFORCIN *et al.*, 2005). A própolis associada à vacina inativada de herpes tipo-1 Suid (SUHV-1) auxiliou na maior produção de anticorpos por camundongos, indicando uma possível utilização do produto apícola como adjuvante em vacinas (FISCHER *et al.*, 2007).

Em relação à atividade antitumoral, células *natural killer* de ratos tratados com própolis apresentaram maior atividade citotóxica sobre células tumorais Yac-1 (SFORCIN *et al.*, 2002). Ademais, a própolis estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias e de IFN- γ e IL-2 por animais portadores de melanoma e que foram submetidos a estresse crônico (MISSIMA *et al.*, 2009), favorecendo a ativação da resposta imune celular antitumoral.

Todos estes dados demonstram a atividade imunomoduladora da própolis, observadas de acordo com as concentrações utilizadas, vias de administração, modelos experimentais, tempo de tratamento, dentre outros fatores, havendo, contudo, dados divergentes. Por esta razão, nosso grupo procurou padronizar as metodologias de estudo, a fim de encontrarmos resultados que favoreçam maiores elucidações a respeito dos mecanismos de ação da própolis e de seus componentes. A respeito destes, os autores têm proposto que as atividades biológicas da própolis podem ser decorrentes de seus efeitos combinados, assim como relataram Sawaya *et al.* (2004) sobre a atividade bactericida da própolis brasileira. Estudos com esse enfoque podem possibilitar a compreensão acerca dos componentes responsáveis pela ação biológica da própolis, bem como o desenvolvimento de novos fármacos formulados a partir desses componentes.

II. Ácidos fenólicos

No início dos estudos de nosso grupo, as amostras de própolis coletadas em nosso apiário apresentaram ausência de sazonalidade e, por sugestão da Dra. Vassya Bankova, do *Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry*, Bulgária, as amostras coletadas foram agrupadas em um único “pool”, o qual foi congelado e tem sido sempre utilizado em nossos estudos. Recentemente, Conti *et al.* (no prelo) reanalisaram esta amostra para investigar possíveis alterações decorrentes de seu congelamento. Os dados obtidos revelaram que sua composição química apresentou-se minimamente alterada, e que esta alteração deve-se ao agrupamento das amostras e não ao seu congelamento. Muitos componentes foram identificados, e em nossos estudos daremos destaque a três deles: ácido cafeico, presente em quantidade correspondente a 0,297% na própolis, ácido dihidrocinâmico (3,04%) e ácido *p*-cumárico (0,382%).

Estes três ácidos são derivados do ácido cinâmico, o qual pertence ao grupo das auxinas (hormônios responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular da planta). Seus derivados desempenham importante papel na defesa da planta contra o ataque de insetos e microorganismos (THIMANN, 1969). Ácidos hidrocínâmicos, tais como os ácidos cafeico e *p*-cumárico, estão presentes na maioria dos tecidos vegetais, em variadas formas conjugadas e, raramente, na forma de

ácidos livres (KARAKAYA, 2004). O ácido cafeico é um dos mais abundantes ácidos hidrocínâmicos presentes na dieta alimentar. Em contrapartida, o ácido *p*-cumárico é menos abundante, sendo encontrado em algumas frutas do gênero *Citrus* (RICE-EVANS *et al.*, 1997).

Estudos realizados com ácidos cafeico, cinâmico e *p*-cumárico revelaram seu potencial anti-inflamatório (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998) e antimicrobiano (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2001; WEN *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ-VAQUERO *et al.*, 2007). Em nosso grupo, estudos de Búfalo *et al.* (2013) demonstraram a capacidade antioxidante do ácido cafeico, bem como seu potencial inibitório sobre a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos. Em estudos realizados *in vitro*, o ácido cinâmico apresentou ação inibitória sobre a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por monócitos humanos, quando utilizado nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL (CONTI *et al.*, no prelo). Como possível mecanismo de ação do ácido cinâmico e do ácido cafeico, estudos de nosso grupo sugerem suas interações com o receptor TLR4 (BÚFALO *et al.*, 2014; CONTI *et al.*, no prelo). Estes mesmos trabalhos apresentaram aumento da atividade fungicida sobre *C. albicans*, em células incubadas com altas concentrações destes ácidos. O potencial anti-inflamatório do ácido *p*-cumárico foi demonstrado por Pragasam *et al.* (2013), em ensaios realizados em ratos com artrite, revelando que o ácido atenuou a expressão sinovial de TNF- α .

III. Monócitos e citocinas

Monócitos e macrófagos são células do sistema fagocítico mononuclear, com papel fundamental na imunidade inata do hospedeiro. Os monócitos, se comparados aos macrófagos, possuem citoplasma e núcleo menores, maior conteúdo de mieloperoxidase e menores níveis de esterases não específicas. São menos aderentes e sua atividade fagocitária é menor, além de expressarem menor número de receptores para a porção Fc de imunoglobulinas ou para o componente C3 do sistema complemento, e menor número de antígenos de histocompatibilidade de classe II. Entretanto, as diferenças entre monócitos e macrófagos são mais quantitativas do que qualitativas, e a diferenciação entre as duas células é comumente difícil de ser percebida (WILTROUT & VAREGIO, 1991). Na circulação sanguínea, há diferentes subtipos de monócitos que apresentam diferentes atividades

quando estimulados com o mesmo estímulo. Como exemplo, monócitos CD14+CD16- constituem a maioria da população de monócitos (80%-90%) e apresentam, quando estimulados com LPS *in vitro*, maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10, se comparada à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α . Já monócitos CD16+, quando estimulados com LPS, produzem TNF- α , apresentando atividade pró-inflamatória (SHI & PAMER, 2011).

As células fagocitárias são as principais atuantes na defesa contra bactérias. Posteriormente à ativação pelo agente patogênico, estas células liberam citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, e intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. Além desses fatores, algumas citocinas são importantes para ativação de monócitos e macrófagos, enquanto que outras induzem desativação celular (SKRZECZYNSKA-MONCZNIK *et al.*, 2008). TNF- α apresenta caráter multifuncional, sendo capaz de induzir a produção de outras citocinas e quimiocinas pelas células do sistema imunológico, induzindo, também, a expressão de moléculas de adesão e o aumento da permeabilidade do endotélio, favorecendo maior concentração de células mononucleares no local inflamado (HEHLGANS *et al.*, 2006). Além destes efeitos, TNF- α induz a produção de IL-10 por monócitos humanos, que, por sua vez, exerce *feedback* negativo para a produção de TNF- α (WANIDWORANUN & STROBER, 1993). Já a IL-10 é importante para manutenção da homeostase do hospedeiro, possuindo ação imunoreguladora (MOSSER, 2003). Esta citocina é capaz de suprimir a síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 produzidos por monócitos estimulados por LPS ou INF- γ (WAAL MALEFYT *et al.*, 1991), além de diminuir a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (STAPLES *et al.*, 2007), favorecendo o retorno da célula ao estado de repouso enquanto a infecção microbiana é erradicada. Alter *et al.* (2010) evidenciaram que altos níveis desta citocina são encontrados em pacientes imunossuprimidos, e estas características conferem-lhe o principal papel como citocina imunossupressora, destacando seu potencial na utilização em terapias para várias doenças inflamatórias (STAPLES *et al.*, 2007).

IV. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria gram-negativa anaeróbia facultativa comumente presente no trato gastrointestinal de mamíferos. Frequentemente, sua presença não causa doenças, exceto em indivíduos imunossuprimidos. No entanto, alguns clones de *E. coli* adquiriram alta virulência, tornando-se muito capazes de colonizar novos nichos e causar danos em hospedeiros saudáveis (KAPER *et al.*, 2004).

As bactérias gram-negativas possuem lipopolissacarídeo (LPS) na parede celular, e esta endotoxina é fortemente reconhecida por macrófagos e monócitos. Quando entra em circulação, o LPS se liga à proteína ligante de LPS (LBP) presente no plasma, e o complexo é reconhecido pelo receptor CD14 presente na superfície celular. Posteriormente, o LPS é transferido ao receptor TLR-4 e sua proteína assessora MD2, estimulando vias de sinalização intracelular que conduzem à ativação de fatores de transcrição responsáveis pela ativação de genes codificantes de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6. Esta forte ativação do sistema imune pode induzir sepse, choque séptico ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica no hospedeiro (GUHA & MACKMAN, 2001).

As bactérias gram-negativas estão entre as principais causas de sepse nos hospitais brasileiros, sendo a *E. coli* um dos principais agentes associados a essas ocorrências, tanto em indivíduos adultos quanto em neonatos (VILLAS BÔAS & RUIZ, 2004; ZANON *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2007). Deste modo, se faz necessária a busca por tratamentos eficientes e de baixo custo capazes de possibilitar o combate às bactérias potencialmente patogênicas.

Objetivos

Neste trabalho procuramos avaliar a interação sinérgica entre alguns componentes da própolis sobre a viabilidade celular, a produção de citocinas pró- e antiinflamatórias (TNF- α e IL-10), e a atividade bactericida de monócitos humanos contra *Escherichia coli*.

Materiais e métodos

I. Obtenção e preparação do extrato etanólico de própolis e dos ácidos

A própolis foi produzida por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), no apiário localizado na Fazenda Experimental Lageado, pertencente à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP, Campus de Botucatu). As amostras foram obtidas através de telas propolisadoras e posteriormente foram congeladas para facilitar a remoção da própolis. Para estabelecer sua caracterização química, o produto apícola foi analisado por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS) (CONTI *et al.*, no prelo). Os extratos foram preparados no momento do uso. Após trituração, 30g de própolis foram colocadas em etanol (70%), completando o volume para 100 mL, em ausência de luz e sob moderada agitação. Após uma semana, os extratos foram filtrados em papel de filtro e a concentração final foi calculada, obtendo-se o peso seco da solução.

Os compostos isolados (ácidos dihidrocinâmico, *p*-cumárico e cafeico) foram fornecidos pelo Prof. Titular Jairo Kenupp Bastos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, e foram utilizados na mesma proporção em que se encontram na própolis: *p*-cumárico ($2,327 \cdot 10^{-1}$ mol.L⁻¹), dihidrocinâmico ($2,0243$ mol.L⁻¹) e cafeico ($1,648 \cdot 10^{-1}$ mol.L⁻¹). Para padronização dos objetivos deste trabalho, os ácidos foram preparados conforme sua porcentagem presente na concentração de 20 µg/mL de própolis. As soluções-mãe foram preparadas através da diluição destes em etanol 70% (BÚFALO *et al.*, 2013). Posteriormente, acrescentamos meio RPMI completo (RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro autólogo inativado).

Para análise do possível efeito sinérgico, incubamos os monócitos com os devidos ácidos isolados ou associados, como descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Volumes de ácidos isolados e combinados entre si utilizados para estimulação de monócitos humanos. A1: ácido cafeico + ácido dihidrocinâmico; A2: ácido cafeico + ácido *p*-cumárico; A3: ácido dihidrocinâmico + ácido *p*-cumárico; A4: ácido cafeico + ácido dihidrocinâmico + ácido *p*-cumárico.

Ácido cafeico	Solução-mãe de ácido cafeico + meio RPMI completo
Ácido dihidrocinâmico	Solução-mãe de ácido dihidrocinâmico + meio RPMI completo
Ácido <i>p</i>-cumárico	Solução-mãe de ácido <i>p</i> -cumárico + meio RPMI completo
Associação 1 (A1)	Solução-mãe de ácido cafeico + solução-mãe de ácido dihidrocinâmico + meio RPMI completo.
Associação 2 (A2)	Solução-mãe de ácido cafeico + solução-mãe de ácido <i>p</i> -cumárico + meio RPMI completo.
Associação 3 (A3)	Solução-mãe de ácido dihidrocinâmico + da solução-mãe de ácido <i>p</i> -cumárico + meio RPMI completo.
Associação 4 (A4)	Solução-mãe de ácido cafeico + solução-mãe de ácido dihidrocinâmico + solução-mãe de ácido <i>p</i> -cumárico + meio RPMI completo.

Para utilização do extrato de própolis, fizemos uma solução-mãe de 2500 µL contendo 500 µg de própolis. Desta, utilizamos, no poço destinado, 50 µL acrescentando 450 µL de meio RPMI completo. Para análise dos efeitos do solvente da própolis (etanol 70%) sobre a viabilidade celular, a produção de citocinas e a atividade bactericida, adicionamos aos poços a concentração mais alta de etanol 70% utilizada para o preparo da solução inicial, no caso, do ácido dihidrocinâmico. Assim, adicionamos 10 µL de etanol 70% em 290 µL de meio RPMI completo e, desta solução, retiramos 0,9 µL e adicionamos no poço, acrescentando 499,1 µL de meio RPMI completo.

II. Obtenção dos monócitos e incubações com os estímulos

O sangue foi obtido de 10 indivíduos voluntários saudáveis, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Medicina, UNESP, Campus de Botucatu (CEP 3442-2010), que assinaram um termo de consentimento para retirada de sangue. As amostras de sangue (20 mL) foram coletadas e colocadas em tubos

estéreis contendo 0,2 mL de heparina. Os tubos contendo o sangue heparinizado foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, aliquotamos 10 mL do líquido contendo meio RPMI e células em 4 mL de Ficoll-Hypaque, e centrifugamos os tubos para separar as células mononucleares das hemácias. O anel rico em células mononucleares foi coletado e lavado em meio RPMI. Em seguida, desprezamos o sobrenadante e o pellet de células foi ressuscitado em meio RPMI completo (RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro autólogo inativado). Deste volume, coletamos 50 µL e adicionamos a 450 µL de corante vermelho neutro 0,02%, incubando durante 10 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, a contagem de monócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração celular foi ajustada para 1x10⁶ células/mL, adicionando 500 µL em cada orifício da placa de cultura celular de 24 poços. A cultura foi mantida a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas. Após este período de tempo, os poços foram lavados com meio RPMI completo para remoção das células não-aderentes, e as células aderentes foram incubadas com os devidos estímulos (própolis, ácidos cafeico, dihidrocinâmico, *p*-cumárico e associações, etanol 70% e LPS 5 µg/mL) por 18 horas.

De tempos em tempos, em nosso Departamento, é realizado o teste para esterase não-específica e análise morfológica, a fim de determinar a quantidade de monócitos presentes entre as células aderentes. Dessa maneira, podemos afirmar que mais de 90% das células aderentes são monócitos (BANNWART *et al.*, 2010).

A própolis e seus componentes isolados foram diluídos em meio RPMI completo contendo 0,1 g/L de L-glutamina, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 10mL/L de aminoácidos não essenciais e suplementado com 10% de soro fetal bovino, de acordo com as combinações apresentadas no Quadro 1. Antes das incubações, os estímulos foram filtrados em filtro de membrana 0,22 µm.

III. Ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT

500 µL contendo 5x10⁵ células foram adicionados em cada orifício da placa de 24 poços, incubando-se a 37°C sob pressão constante de 5% de CO₂ por 18 h, na presença de extrato hidroalcoólico de própolis, ácidos dihidrocinâmico, *p*-cumárico e

cafeico, e nas combinações apresentadas no Quadro 1. Células controle foram incubadas somente com meio de cultura. A viabilidade celular foi analisada através do método do teste colorimétrico do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich), incubando-se as células com 300 µL de MTT na concentração de 1 mg/mL em meio RPMI completo por 3 h. Após a incubação, o MTT foi removido e 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para, em seguida, este volume ser transferido para placas de 96 poços, permitindo a leitura da densidade óptica em leitor de ELISA a 540 nm (NAJAFI *et al.*, 2007).

IV. Dosagem de citocinas pela técnica de ELISA

A determinação das concentrações de IL-10 e TNF- α foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Primeiramente, uma solução contendo tampão carbonato-bicarbonato e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R&D Systems, EUA) foi adicionada às placas de poliestireno (Maxisorp-Nunc, EUA) e incubadas overnight a 4° C em câmara úmida. Após lavagem dos poços com solução salina tamponada (PBS) acrescida de Tween 20 (0,05%), os sítios de ligação foram saturados com solução de PBS + BSA (1%) e, em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, nova sequência de lavagens foi realizada e alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes das culturas celulares, 100 µL de PBS + BSA em dois poços para determinação do *blank* e 100 µL do anticorpo padrão diluído em PBS + BSA por diluição seriada para determinação da curva, foram adicionadas com posterior incubação por 2h a temperatura ambiente. Após esse período, novas lavagens foram realizadas e estreptoavidina diluída em PBS + BSA foi adicionada aos poços, incubando-se a placa ao abrigo de luz por 20 minutos. Após a lavagem da placa com PBS+Tween, adicionamos uma solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em solvente orgânico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), para nova incubação em ambiente protegido de luz por mais 20 minutos. Ao fim deste período, adicionamos H₂SO₄ 2N para bloquear a reação, realizando a leitura da placa em leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

V. Atividade bactericida de monócitos

Com relação à atividade bactericida de monócitos, contamos com o auxílio do Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez – docente de nosso Departamento, para indicação da cepa adequada para este estudo. Pelo fato de o monócito ser uma célula sanguínea, foi-nos sugerido que utilizássemos cepa de *Escherichia coli* obtida a partir da circulação periférica de paciente com sepse.

Após obtenção da amostra, a mesma foi cultivada em caldo Luria-Bertani (LB), a 37°C, *overnight*. A população bacteriana, empregada nos ensaios com monócitos, foi ajustada pela escala 0.5 de MacFarland em solução salina 0,9%, contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Após o ajuste final da densidade ótica pela escala de MacFarland, o número de UFC foi confirmado por diluições seriadas e subsequente plaqueamento em Ágar MacConkey.

As proporções inicialmente testadas de bactéria/monócito foram as seguintes: 25:1, 50:1, 100:1, 500:1, verificando que a melhor proporção foi aquela de 25:1, a qual foi adotada por apresentar atividade bactericida da ordem de 28,0%. Em geral, uma boa atividade bactericida ou fungicida encontra-se na faixa de 20 a 30%, pois assim pode-se verificar a ação estimuladora ou inibitória dos estímulos sobre as células estudadas a partir desta porcentagem, conforme observado em trabalhos da literatura (MURAD *et al.*, 2002; ORSI *et al.*, 2005).

Os monócitos foram obtidos como descrito anteriormente e, posteriormente à incubação destes com as variáveis em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino por 18 h, os sobrenadantes das culturas foram retirados e os monócitos foram desafiados com as bactérias na proporção mencionada, por 2 h. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em tubos de ensaio previamente esterilizados. Os poços foram lavados com Triton X-100 1%, para remoção e lise dos monócitos aderidos, e, conseqüentemente, liberação das bactérias fagocitadas. O volume total obtido com a remoção do sobrenadante e as lavagens dos poços com Triton X-100 e solução salina 0,9% foi de 10 mL. Destes, 20 µL foram plaqueados em ágar MacConkey, para avaliar o posterior crescimento bacteriano e calcular a atividade bactericida dos monócitos. Após 24 h, o número de UFC de *E. coli* foi determinado e a porcentagem (%) da atividade bactericida foi calculada através da seguinte fórmula:

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

VI. Análise estatística

Para análise dos dados obtidos, utilizamos Análise de Variância (ANOVA), seguida de teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Resultados e discussão

Sabe-se que a própolis afeta a imunidade inata principalmente através da modulação da atividade de macrófagos (SZLISZKA *et al.*, no prelo). Porém não está claro até o presente momento qual(is) componente(s) da própolis seria(m) responsável(is) por suas atividades, embora a literatura pertinente sugira o efeito sinérgico dos mesmos (KUJUMGIEV *et al.*, 1999). Assim, na tentativa de elucidar possíveis constituintes responsáveis por seus efeitos nas variáveis aqui avaliadas, optamos por estudar os ácidos cafeico, *p*-cumárico e dihidrocinâmico, sendo nosso trabalho pioneiro no tocante à investigação da ação sinérgica, pois esta sempre é aventada nos artigos científicos, mas nunca foi investigada de fato. Além disso, é importante ressaltar que há pouquíssimos dados na literatura sobre a ação imunomoduladora da própolis e seus componentes em células humanas.

I. Viabilidade celular

Os resultados referentes aos ensaios de citotoxicidade, realizados pelo método do teste colorimétrico do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT-Sigma-Aldrich), estão dispostos na Figura 1.

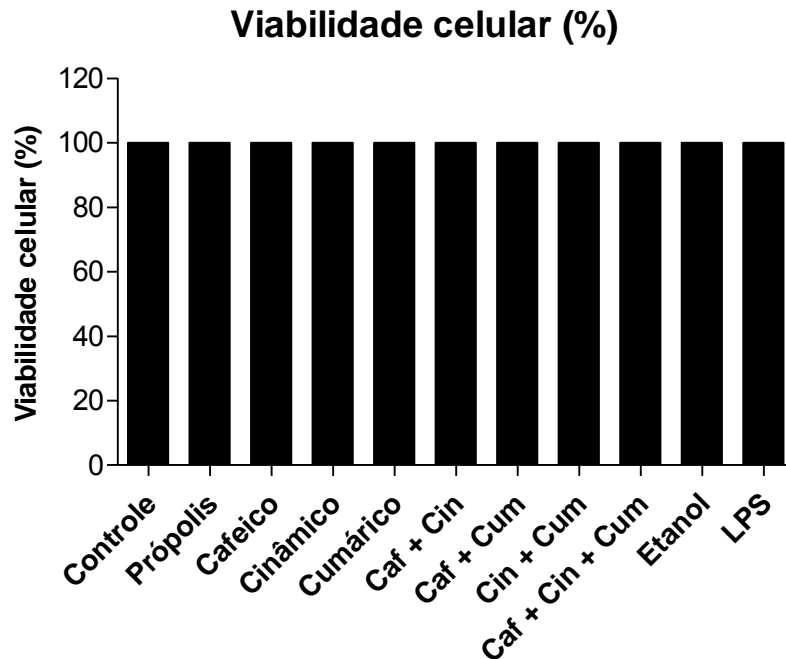


Figura 1. Porcentagem da viabilidade de monócitos humanos incubados com própolis (20 $\mu\text{g/mL}$); ácidos cafeico (caf), dihidrocinâmico (cin) e *p*-cumárico (cum) (isolados ou em associação); etanol 70% e LPS (5 $\mu\text{g/mL}$). Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 experimentos similares ($p > 0,05$).

Conforme observado na Figura 1, os estímulos avaliados não apresentaram atividade citotóxica ($p > 0,05$), corroborando os dados de Búfalo *et al.* (2014) e Conti *et al.* (no prelo), os quais avaliaram a viabilidade celular após incubação com própolis ou com ácido cafeico e ácido cinâmico, respectivamente.

Em relação à toxicidade da própolis, Burdock (1998) relatou que sua DL50 variou, em camundongos, de 2000 a 7300 mg/kg, sugerindo que a concentração segura para uso diário em humanos é de 1,4 mg/kg. A quantidade de própolis utilizada em nossos experimentos *in vitro* foi muito menor do que a utilizada *in vivo*, confirmando, assim, sua segurança.

Kadoma & Fujisawa (2008) verificaram que as concentrações citotóxicas dos ácidos cafeico e *p*-cumárico capazes de matar 50% (CC₅₀) de macrófagos RAW 264.7 foram, respectivamente, 13 mM e 61 mM. Conti *et al.* (no prelo) e Búfalo *et al.* (2014) utilizaram 5, 10, 25, 50 e 100 μL de ácido cinâmico. Todas estas sendo concentrações bem menores que as utilizadas em nossos ensaios.

II. Produção de citocinas

As citocinas TNF- α e IL-1 β são responsáveis por mediar respostas inflamatórias locais e sistêmicas. Entre seus efeitos pleiotrópicos, TNF- α exerce papel endócrino na patogenia do choque endotóxico induzido por LPS (ZHANG *et al.*, 1996) e doenças infecciosas, como a coccidioidomicose (DOOLEY *et al.*, 1994) e paracoccidioidomicose (PARISE-FORTES *et al.*, 2000). Assim, o LPS e TNF- α são considerados agentes pró-inflamatórios e ativadores do fator de transcrição NF- κ B, o qual resulta na ativação de genes envolvidos na inflamação, sobrevivência, diferenciação e crescimento celular (DOBROVOLSKAIA & KOZLOV, 2005).

Em nosso estudo, verificamos a produção de TNF- α por monócitos humanos incubados com os ácidos, em combinação ou não, em duas situações: em ausência e presença de estímulo inflamatório (LPS). Estes dados estão representados nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Em ausência de LPS, os monócitos estimulados com própolis, com as combinações 2 a 2 (cafeico + dihidrocinâmico ou cafeico + *p*-cumárico), ou com os 3 componentes (cafeico + dihidrocinâmico + *p*-cumárico), apresentaram maior produção de TNF- α , se comparadas com o grupo controle (sem LPS) ($p < 0,05$). Isoladamente, os ácidos estudados não afetaram a produção desta citocina, assim como a combinação ácido dihidrocinâmico + ácido *p*-cumárico. Da mesma forma que para a IL-10, o etanol 70% não afetou a produção de TNF- α por monócitos.

Ao compararmos esses dados com a produção de TNF- α desencadeada pela própolis, nota-se que somente as associações 2 a 2 (cafeico + dihidrocinâmico; cafeico + *p*-cumárico) e 3 a 3 (cafeico + dihidrocinâmico + *p*-cumárico) apresentaram padrão de produção semelhante ao da própolis. Este achado sugere que o efeito da própolis sobre a produção de TNF- α parece ser resultante da presença do ácido cafeico, seja em combinações 2 a 2 com os ácidos dihidrocinâmico e *p*-cumárico, ou 3 a 3.

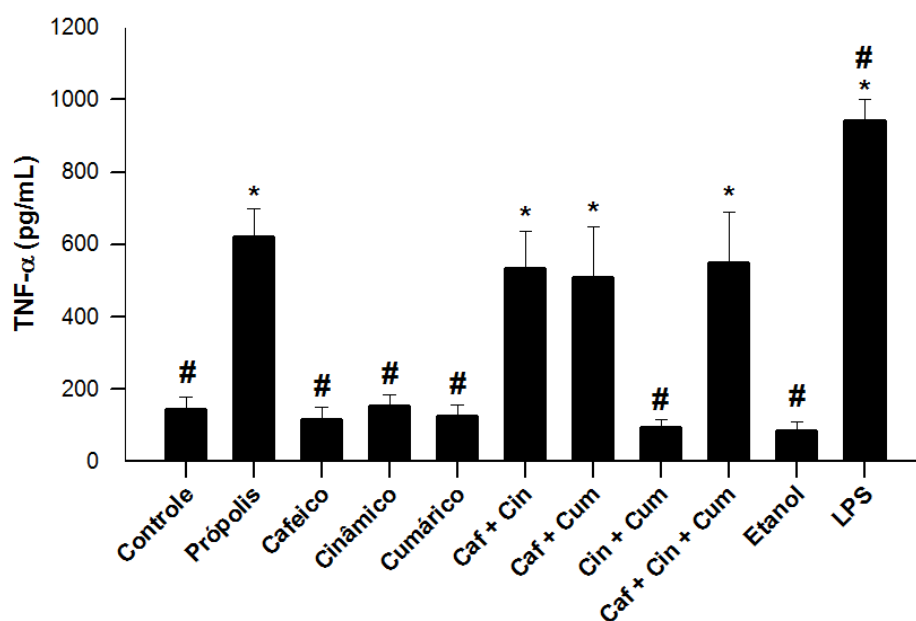


Figura 2. Produção de TNF- α (pg/mL) por monócitos humanos estimulados com própolis, ácidos cafeico (caf), dihidrocinâmico (cin) e *p*-cumárico (cum) e suas associações, etanol 70% e LPS por 18 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 experimentos similares. * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$); # significativamente diferente da própolis ($p < 0,05$).

Por outro lado, conforme apresentado na Figura 3, quando em presença de um estímulo inflamatório, os monócitos desafiados com a própolis, seus ácidos e suas combinações entre eles, não apresentaram alteração na produção de TNF- α induzida pelo LPS.

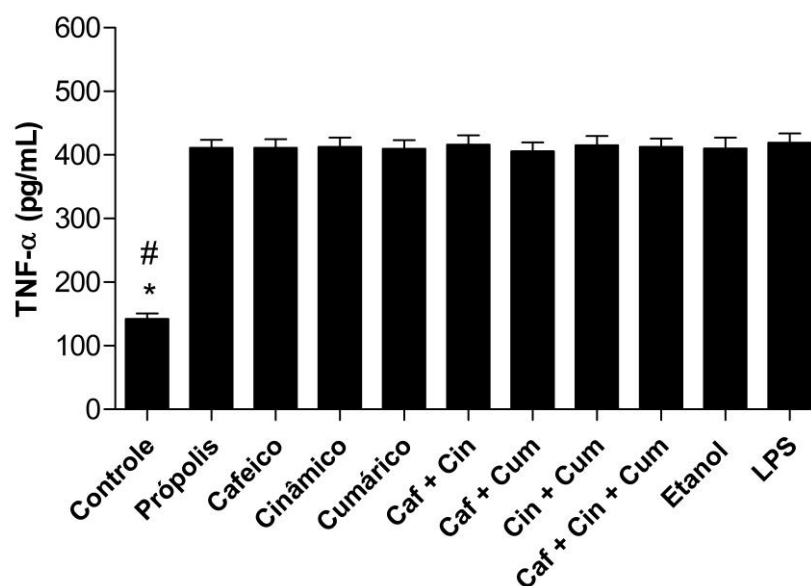


Figura 3. Produção de TNF- α (pg/mL) por monócitos humanos estimulados com LPS associado aos estímulos: própolis, ácidos cafeico (caf), dihidrocinâmico (cin) e *p*-cumárico (cum) e suas associações e etanol 70% por 18 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 experimentos similares. * significativamente diferente do LPS ($p < 0,05$); # significativamente diferente da própolis ($p < 0,05$).

No que confere à produção de IL-10, os resultados apresentados nas Figuras 4 e 5 representam a produção desta citocina em ausência (Figura 4) e em presença (Figura 5) de LPS. Em ausência de LPS, os resultados mostram que os monócitos apresentaram maior produção de IL-10 quando estimulados com a própolis e seus componentes isolados ou combinados, em relação aos monócitos controle ($p < 0,05$).

Ao compararmos a produção desencadeada pelos componentes com aquela estimulada pela própolis, observamos que os ácidos cafeico e dihidrocinâmico isoladamente, e a associação entre 2 componentes (cafeico + *p*-cumárico ou dihidrocinâmico + *p*-cumárico) apresentaram, estatisticamente, produção semelhante àquela apresentada pela própolis. Observamos também que o ácido *p*-cumárico e a associação entre os três componentes induziram maior produção de IL-10 que aquela apresentada pelo produto apícola ($p < 0,05$). O solvente da própolis (etanol 70%) não afetou a produção de IL-10 por monócitos humanos.

De acordo com estes resultados, pode-se inferir que a escolha dos componentes estudados revelou sua participação na ação da própolis, visto que, tanto isoladamente

quanto 2 a 2 ou 3 a 3, a produção desta citocina foi igual ou maior que aquela desencadeada pelo extrato de própolis. É importante salientar que, além dos constituintes avaliados neste estudo, outros compostos também poderiam ser responsáveis pela ação da própolis, isolada ou sinergicamente.

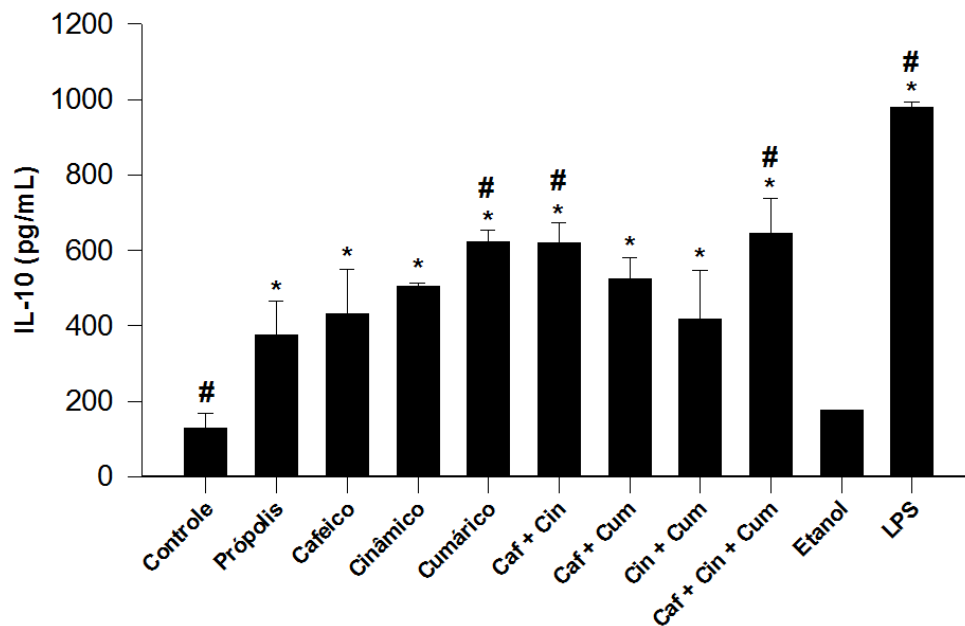


Figura 4. Produção de IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos estimulados com própolis, ácidos cafeico (caf), dihidrocinâmico (cin) e *p*-cumárico (cum) e suas associações, etanol 70% e LPS por 18 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 experimentos similares. * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$); # significativamente diferente da própolis ($p < 0,05$).

No que confere à produção de IL-10 por monócitos previamente desafiados por LPS, o ácido dihidrocinâmico isolado induziu maior produção de IL-10 se comparada àquela induzida pelo LPS.

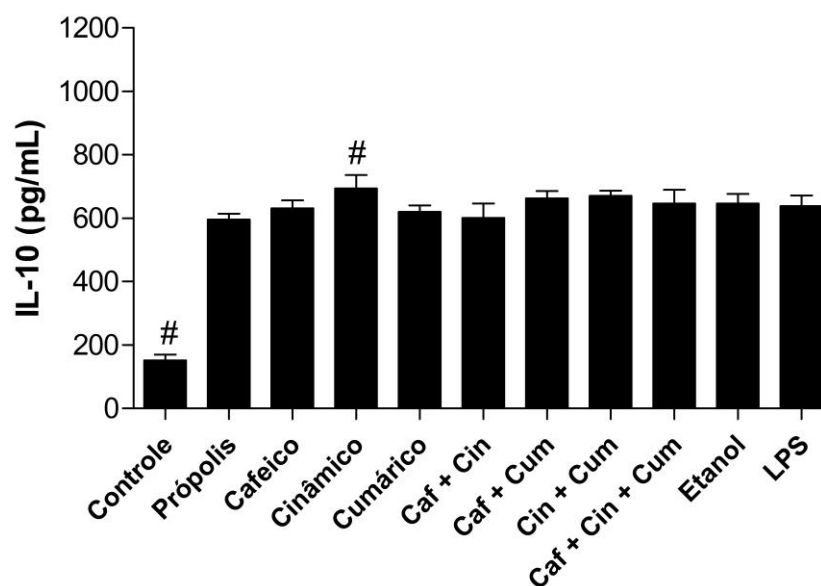


Figura 5. Produção de TNF- α (pg/mL) por monócitos humanos estimulados com LPS associado aos estímulos: própolis, ácidos cafeico (caf), dihidrocinâmico (cin) e *p*-cumárico (cum) e suas associações e etanol 70% por 18 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 experimentos similares. * significativamente diferente do LPS ($p < 0,05$); # significativamente diferente da própolis ($p < 0,05$).

Diversos autores têm demonstrado o caráter tanto pró- como antiinflamatório da própolis. Em trabalhos anteriores de nosso grupo, avaliamos a produção de TNF- α e IL-10 por monócitos estimulados com própolis *in vitro*. Este apiterápico estimulou significativamente a produção de TNF- α (nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e de IL-10 (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) (BÚFALO *et al.*, submetido). Nossos resultados estão de acordo com estes autores, visto que a própolis estimulou a produção destas citocinas, na mesma concentração (20 $\mu\text{g/mL}$). Dimov *et al.* (1994) também verificaram que este produto apícola estimulou a produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos. Bachiega *et al.* (2012) verificaram aumento na produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais incubados com própolis e seus constituintes (ácidos cinâmico e cumárico), enquanto a produção de IL-6 e IL-10 foi inibida pelos mesmos. Por outro lado, macrófagos Raw 264.7, quando tratados com diferentes concentrações de própolis, apresentaram inibição das vias de sinalização intracelular p38 MAPK, JNK1/2 e NF- κB , bem como na produção de óxido nítrico (NO) (BÚFALO *et al.*, 2013). Szliska *et al.* (no prelo) verificaram que macrófagos J774A.1 ativados com LPS e IFN- γ apresentaram diminuição na produção de TNF- α , quando

incubados com as concentrações de 25 e 50 µg/mL de extrato metanólico de própolis. Referente à produção de IL-10, esta não foi afetada pela concentração mais baixa estudada (25 µg/mL), sugerindo um possível efeito antiinflamatório do extrato utilizado.

No que confere à compreensão da atividade antiinflamatória *in vitro*, Hori *et al.* (no prelo) relataram que a própolis inibiu a ativação do inflamassoma, sendo seus efeitos conferidos por diferentes concentrações utilizadas *in vitro*. Além disso, os diferentes períodos de ingestão ou tratamento com própolis conferem perfil pró- ou antiinflamatória a sua ação. Como exemplo, Orsi *et al.* (2000) verificaram que a administração de própolis a camundongos a curto prazo (2 a 3 dias) induziu ativação de macrófagos. Porém, Missima *et al.* (2010) verificaram que o tratamento a longo prazo (2 semanas) apresentou efeito inibitório na produção de citocinas por células Th1 e Th2. Tanaka *et al.* (2012) apresentaram novas pistas sobre a ação antiinflamatória da própolis, verificando que o consumo diário do produto apícola suprimiu os efeitos da artrite induzida por colágeno em camundongos, correlacionando este efeito à diminuição da produção da citocina IL-17, além da inibição na diferenciação de células Th17.

Além da própolis, seus componentes isolados também têm sido alvos da curiosidade dos pesquisadores. Estudos com ácidos cafeico, cinâmico e *p*-cumárico registraram seu potencial antimicrobiano (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2001; WEN *et al.*, 2003; RODRÍGUEZ VAQUERO *et al.*, 2007) e antiinflamatório (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998). A respeito do ácido cafeico, Búfalo *et al.* (2013) demonstraram que este componente apresentou capacidade antioxidante, além de inibir a produção de NO por macrófagos. No que se refere à produção de citocinas, nossos resultados demonstraram que esse ácido não induz a produção de TNF- α , quando utilizado isoladamente; contudo, a produção de TNF- α é estimulada quando o ácido cafeico encontra-se em associação com os outros componentes analisados. Assim, mais estudos são necessários para elucidar como essas interações atuam sobre a produção de citocinas por monócitos e de que forma, seja ocupando receptores celulares ou adentrando inespecificamente pela membrana celular.

Estudos realizados em nosso laboratório revelaram que o ácido cinâmico inibiu a produção de TNF- α e IL-10 por monócitos humanos, quando incubados com concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL do mesmo. Em projeto anterior desenvolvido

por nosso grupo, avaliamos também possíveis alvos de ligação dos componentes da própolis, bloqueando os receptores TLR-2 e TLR-4. O bloqueio destes receptores seria uma das maneiras de avaliar se a ação da própolis e dos compostos isolados depende ou não destes receptores, já que constituintes poderiam se ligar a eles e exercer sua ação biológica. Nos ensaios de bloqueio, a produção de TNF- α e IL-10 por monócitos humanos foi inibida somente pelo anti-TLR-4 (BÚFALO *et al.*, submetido). Este fato sugeriu a participação deste receptor celular na atividade biológica da própolis sobre estas células, embora outros receptores de superfície que não foram estudados possam também estar envolvidos, tais como a dectina-1, o receptor de manose (MR), receptor para o sistema complemento (CR), entre outros, os quais são capazes de reconhecer produtos microbianos, levando à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (UNDERHILL & OZINSKY, 2002).

A produção de TNF- α e IL-10 apresentou-se inibida com bloqueio do receptor TLR-4 anterior à incubação com ácido cafeico ou cinâmico, sugerindo ser este receptor um possível alvo de ligação destes componentes, desencadeando a ativação de fatores nucleares de transcrição, responsáveis por induzir a expressão gênica de citocinas (BÚFALO *et al.*, submetido; CONTI *et al.*, no prelo). Nossos resultados não apresentaram influência dos ácidos sobre a produção de TNF- α , contudo os mesmos estimularam a produção de IL-10, assemelhando-se à atividade da própolis, confirmando, assim, seu provável potencial antiinflamatório.

Vale ressaltar que, em todos os trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo (BACHIEGA *et al.*, 2012; BÚFALO *et al.*, 2014; CONTI *et al.*, no prelo), as concentrações utilizadas, tanto de ácido cafeico como de ácido dihidrocinâmico, foram iguais à da própolis. No presente trabalho, foi calculada inicialmente a proporção em que os ácidos estudados aparecem na composição química do apiterápico, de modo que o possível sinergismo avaliado pudesse refletir a real participação dos componentes na ação da própolis. Portanto, as concentrações utilizadas em nossos experimentos foram bem menores que as utilizadas nos trabalhos supracitados.

Dessa maneira, com base nos resultados obtidos em nosso projeto atual e nos projetos anteriores, estamos compreendendo melhor em quais condições a própolis e seus compostos, tanto isoladamente quanto em associação, podem modular as células estudadas. Assim, poderíamos utilizar futuramente o potencial pró-inflamatório

deste apiterápico em terapêuticas vacinais, devido ao seu papel adjuvante e a sua reconhecida ação na resposta imune humoral, contribuindo para a maior produção de anticorpos (SFORCIN *et al.*, 2005). Igualmente, o caráter antiinflamatório da própolis poderia ser explorado, em conjunto com outras terapias, no tratamento de doenças inflamatórias, auxiliando na minimização de reações indesejáveis. Trabalhos experimentais de Pragasam *et al.* (2013) demonstraram que o ácido *p*-cumárico atenuou a expressão sinovial de TNF- α em ratos com artrite, demonstrando seu efeito antiinflamatório. Em nossos resultados, o ácido *p*-cumárico não afetou a produção de TNF- α , porém foi responsável pela grande produção de IL-10, superando a produção da mesma estimulada pela própolis e demonstrando o potencial antiinflamatório deste componente.

III. Atividade bactericida

A atividade bactericida de monócitos contra *Escherichia coli* foi determinada com base na proporção (bactéria:monócito): 25:1.

Conforme observado na Figura 6, o ácido dihidrocinâmico foi o constituinte que mais estimulou a atividade bactericida, quer isoladamente ou em combinação com o ácido *p*-cumárico.

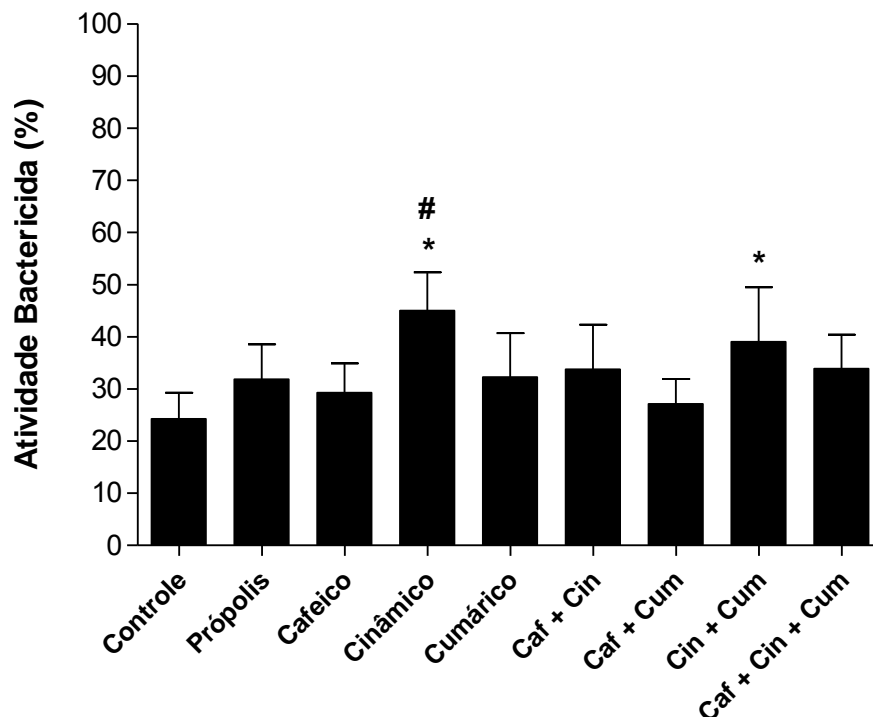


Figura 6. Atividade bactericida (%) de monócitos humanos estimulados com própolis, ácidos cafeico (caf), dihidrocinâmico (cin) e *p*-cumárico (cum) e suas associações por 18 h e desafiados com *Escherichia coli* por 2 h. Os dados representam a média e desvio-padrão de 10 experimentos similares. * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$); # significativamente diferente da própolis ($p < 0,05$).

Trabalhos anteriores de nosso grupo revelaram que a própolis aumenta a atividade bactericida de macrófagos peritoneais de camundongos contra *Salmonella Typhimurium* (ORSI *et al.*, 2005) e a atividade fungicida destas mesmas células contra *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD *et al.*, 2002), porém em concentrações mais elevadas que as utilizada neste projeto. Há inúmeros trabalhos realizados sobre o efeito imunomodulador da própolis em camundongos (ORSI *et al.*, 2000; ORSATTI *et al.*, 2010). Recentemente, tivemos o interesse em iniciar os estudos com monócitos humanos (BÚFALO *et al.*, 2014; CONTI *et al.*, no prelo), verificando que a incubação com própolis ou ácido cinâmico e cafeico aumentou a atividade fungicida contra *Candida albicans*, porém em concentrações mais elevadas (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, é difícil comparar nossos dados, visto que há pouquíssimos dados na literatura sobre a ação dos componentes da própolis em células humanas. Dessa maneira, esta monografia veio a somar com a consolidação dos dados obtidos por

nosso grupo, fortalecendo o início dos estudos com componentes da própolis e com células humanas.

Conclusão

Segundo os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a própolis e seus componentes não apresentam atividade citotóxica contra monócitos humanos cultivados *in vitro*, viabilizando os estudos com estes produtos nestas células. O produto apícola, seus ácidos e associações também possuem efeito imunomodulador na produção das citocinas TNF- α e IL-10, e na atividade bactericida de monócitos humanos, indicando que os componentes da própolis aqui estudados podem ser os responsáveis por seus efeitos imunomoduladores. No entanto, trabalhos futuros poderão responder quais os mecanismos de ação são responsáveis pela atividade biológica do apiterápico e seus componentes, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Referências bibliográficas

- ALTER, G., KAVANAGH, D., RIHN, S. IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 1905–1913, 2010.
- BACHIEGA, T.F., ORSATTI, C.L., PAGLIARONE, A.C., SFORCIN, J.M. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1308-1313, 2012.
- BANKOVA, V., BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., POPOV, S., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, p. 361-367, 1998.
- BANKOVA, V.S., BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., SFORCIN, J.M., FRETE, X., KUJUMGIEV, A., MAIMONI RODELLA, R., POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 54, p. 401-5, 1999.
- BANNWART, C.F.; PERAÇOLI, J.C.; NAKAIRA-TAKAHAGI, E.; PERAÇOLI, M.T.S. Inhibitory effect of silibinin on tumour necrosis factor- α and hydrogen peroxide production by human monocytes. **Natural Product Research**, v. 24, p. 1747-1757, 2010.
- BOUDOUROVA-KRASTEVA, G., BANKOVA, V., SFORCIN, J.M., NIKOLOVA, N., POPOV, S. Phenolics from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p. 676-679, 1997.
- BÚFALO, M.C., CANDEIAS, J.M., SFORCIN, J.M. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 483-487, 2009a.
- BÚFALO, M.C., FIGUEIREDO, A.S., DE SOUSA, J.P.B., CANDEIAS, J.M., BASTOS, J.K., SFORCIN, J.M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1669-1680, 2009b.
- BÚFALO, M.C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LIBERAL, J.; CRUZ, M.T.; LOPES, M.C.; BATISTA, M.T.; SFORCIN, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 84–92, 2013.
- BÚFALO, M.C.; GRACIANI, A.P.B.; 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 (10), p. 1497-1504, 2014.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

- CONTI, B.J., BÚFALO, M.C., GOLIM, M.A., BANKOVA, V., SFORCIN, J.M. Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, no prelo.
- CUNHA, I.B.S., SAWAYA, A.C.H.F., CAETANO, F.M., SHIMIZU, M.T., MARCUCCI, M.C., DREZZA, F.T., POVIA, G.S., CARVALHO, P.O. Factors that influence the yield and composition of brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, p. 964-970, 2004.
- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V.; NIKOLOV, N.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. **Apidologie**, v. 22, p. 155-62, 1991.
- DOBROVOLSKAIA, M.A.; KOZLOV, S.V. Inflammation and cancer: When NF- κ B amalgamates the perilous partnership. **Current Cancer Drug Targets**, v. 5, p. 325-344, 2005.
- DOOLEY, D.P.; COX, R.A.; HESTILOW, K.L.; DOLAN, M.J.; MAGEE, D.M. Cytokine induction in human coccidioidomycosis. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3980-3983, 1994.
- FERNÁNDEZ, M.A.; SÁENZ, M.T.; GARCÍA, M.D. Natural Products: Anti-inflammatory Activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, p. 1183-1186, 1998.
- FERRONATO, R., MARCHESAN, E.D., PEZENTI, E., BEDNARSKI, F., ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 224-230, 2007.
- FISCHER, G., CONCEIÇÃO, F.R., LEITE, F.P., DUMMER, L.A., VARGAS, G.A., HUBNER, S.O., DELLAGOSTIN, O.A., PAULINO, N., PAULINO, A.S., VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, p. 1250-1256, 2007.
- FREITAS, S.F., SHINOHARA, L., SFORCIN, J.M, GUIMARÃES, S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, p. 170-175, 2006.
- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling*, v. 13, p. 85-94, 2001.
- HEHLGANS, T., PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, p. 28398, 2006.
- HORI, J.I.; ZAMBONI, D.S.; CARRÃO, D.B.; GOLDMAN, G.H.; BERRETTA, A.A. The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, no prelo.

- KADOMA, Y.; FUJISAWA, S. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. **Molecules**, v. 13 (10), p. 2488-2499, 2008.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.
- KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44 (6), p. 453-464, 2004.
- KOO, H., GOMES, B.P.F.A., ROSALEN, P.L., AMBROSANO, G.M.B., PARK, Y.K., CURY, J.A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, p. 141-148, 2000.
- KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.
- MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., ORSATTI, C.L., ARAÚJO Jr., J.P., SFORCIN, J.M. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1501-1507, 2010.
- MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., ORSATTI, C.L., SFORCIN, J.M. The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, p. 11-15, 2009.
- MISSIMA, F., SFORCIN, J.M. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 71-75, 2008.
- MISSIMA, F., SILVA-FILHA, A.A., NUNES, G.A., BUENO, P.C.P., DE SOUSA, J.P.B., BASTOS, J.K., SFORCIN, J.M. Effects of Baccharis dracunculifolia D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 463-468, 2007.
- MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 209-212, 2003.
- MURAD, J.M., CALVI, S.A., SOARES, A.M.V.C., BANKOVA, V., SFORCIN, J.M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 331-334, 2002.
- NAJAFI, M.F., VAHEDY, F., SEYYEDIN, M., JOMEHZADEH, H.R., BOZARY, K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. **Cytotechnology**, v. 54, p. 49-56, 2007.
-

- ORSATTI, C.L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., BACHIEGA, T.F., BÚFALO, M.C., ARAÚJO JR., J.P., SFORCIN, J.M. Propolis immunomodulatory action *in vivo* on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1141–1146, 2010.
- ORSI, R.O., FUNARI, S.R.C., SOARES, A.M.V.C., CALVI, S.A., OLIVEIRA, S.L., SFORCIN, J.M., BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **The 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.
- PAGLIARONE, A.C., MISSIMA, F., ORSATTI, C.L., BACHIEGA, T.F., SFORCIN, J.M. Propolis effects on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 230-233, 2009a.
- PAGLIARONE, A.C., ORSATTI, C.L., BÚFALO, M.C., MISSIMA, F., BACHIEGA, T.F., ARAÚJO Jr., J.P., SFORCIN, J.M. Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 1352-1356, 2009b.
- PARISE-FORTES, M.R.; SILVA, M.F.; SUGIZAKI, M.F.; DEFAVERI, J.; MONTENEGRO, M.R.; SOARES, A.M. Experimental paracoccidiodomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Medical Mycology**, v. 38, p. 51-60, 2000.
- PINHEIRO, R.S.; FERREIRA, L.C.L.; BRUM, I.R.; GUILHERME, J.P.; MONTE, R.L. Estudo dos fatores de risco maternos associados à sepse neonatal precoce em hospital terciário da Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29(8), p. 387-395, 2007.
- PRAGASAM, S.J.; VENKATESAN, V.; RASOOL, M. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effect of *p*-Coumaric Acid, a Common Dietary Polyphenol on Experimental Inflammation in Rats. **Inflammation**, v. 36, p. 169-176, 2013.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p. 494-507, 2001.
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v. 2 (4), p. 152-159, 1997.
- RODRÍGUEZ VAQUERO, M.J.; ALBERTO, M.R.; MANCA DE NADRA, M.C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v.18, p. 93-101, 2007.
-

- SAWAYA, A.C.H.F., SOUZA, K.S., MARCUCCI, M.C., CUNHA, I.B.S., SHIMIZU, M.T. Analysis of the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.
- SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.
- SFORCIN, J.M., FERNANDES JR., A., LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.
- SFORCIN, J.M., FERNANDES JR., A., LOPES, C.A.M., FUNARI, S.R.C., BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, p. 139-144, 2001.
- SFORCIN, J.M., KANENO, R., FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 19-29, 2002.
- SFORCIN, J.M., ORSI, R.O., BANKOVA, V. Effects of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.
- SFORCIN, J.M., ORSI, R.O., BANKOVA, V. Effects of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.
- SHI, C.; PAMER, E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 762-774, 2011.
- SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, J., BZOWSKA, M., LOSEKE, S., GRAGE-GRIEBENOW, 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.
- STAPLES, K.J.; SMALLIE, T.; WILLIAMS, L.M.; FOEY, A.; BURKE, B.; FOXWELL, B.M.J.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. IL-10 induces IL-10 in Primary Human Monocyte-Derived Macrophages via the Transcription Factor Stat3. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 4779-4785, 2007.
- SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A.Z.; SOKÓL-LETOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, Z.P.; KRÓL, W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, no prelo.
- TANAKA, M.; OKAMOTO, Y.; FUKUI, T.; MASUZAWA, T. Suppression of interleukin 17 production by Brazilian propolis in mice with collagen-induced arthritis. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 19-26, 2012.

- THIMANN, K.V., The auxins, in: M.B. Wilkins (Ed.), **Physiology of Plant Growth and Development**, McGraw–Hill, p. 2–45, 1969.
- UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 825-852, 2002.
- VILLAS BÔAS, P.J.F.; RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. **Revista de Saúde Pública**, v. 38(3), p. 372-378, 2004.
- WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; VRIES, J.E. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 1209-1220, 1991.
- WANIDWORANUN, C.; STROBER, W. Predominant role of tumor necrosis factor- α in human monocyte IL-10 synthesis. **The Journal of Immunology**, v. 151, p. 6853-6861, 1993.
- WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, v. 20, p. 305-311, 2003.
- WILTROUT, R.H., VARESIO, L. Activation of macrophages for cytotoxic and suppressor – effector functions. In: OPPENHEINN, D. **Immunophysiology**, p. 365-85, 1991.
- ZANON, F.; CAOVILO, J.J.; MICHEL, R.S.; CABEDA, E.V.; CERETTA, D.F.; LUCKEMEYER, G.D.; BELTRAME, C. POSENATTO, N. Sepsis na unidade de terapia intensiva: etiologia, fatores prognósticos e mortalidade. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20 (2), p. 128-134, 2008.