

AÇÃO DA PRÓPOLIS ASSOCIADA AO DOCETAXEL SOBRE
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA E
SOBRE MONÓCITOS HUMANOS

ELIZA DE OLIVEIRA CARDOSO

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

Orientador: Prof. Adj. José Maurício Sforcin
Co-orientadora: Dra. Karina Basso Santiago



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AÇÃO DA PRÓPOLIS ASSOCIADA AO DOCETAXEL SOBRE
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA E
SOBRE MONÓCITOS HUMANOS

ELIZA DE OLIVEIRA CARDOSO

ORIENTADOR: PROF. ADJ. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

CO-ORIENTADORA: DRA. KARINA BASSO SANTIAGO

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

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

Cardoso, Eliza de Oliveira.

Ação da própolis associada ao docetaxel sobre células de câncer de mama e sobre monócitos humanos / Eliza de Oliveira Cardoso. - Botucatu, 2021

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

Orientador: José Maurício Sforcin
Coorientador: Karina Basso Santiago
Capes: 20100000

1. Mamas - Câncer. 2. Imunomodulação. 3. Própolis.
4. Docetaxel. 5. Monócitos. 6. Quimioterapia combinada.
7. Medicina alternativa.

Palavras-chave: Câncer de mama; Docetaxel; Imunomodulação; Própolis.

*Dedico este trabalho a todos os que ainda
possuem esperança no Brasil.*

Agradecimentos

Ao orientador e amigo José Maurício Sforcin, que docemente me acolheu em seu grupo de trabalho e que tem me ajudado a crescer como pessoa e como profissional. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pelo carinho e pelo companheirismo de todos os dias. Tenho poucas linhas aqui para dizer tudo o que deve ser dito, mas espero poder dizer durante todos os dias dessa grande amizade.

À minha co-orientadora Dra. Karina Basso Santiago, pelo empenho, companheirismo e amizade de todos os dias. Boa sorte no caminho da docência e que seus sonhos se realizem!

Aos meus companheiros de laboratório e pós-graduação Fernanda Conte, Karen Tasca, Arthur Sartori, Mariana Honório, Nicolas Ripari e Bruno Conti pelos suores derramados, pelas gargalhadas e pelos desabafos durante o café. Desejo que vocês tenham o sucesso que quiserem alcançar. Agradecimento especial também a todos que passaram pelo LIPNA durante minha estadia e que me auxiliaram no caminho percorrido até este momento.

À Dra. Graziela Romagnoli pela amizade, companheirismo e por toda ajuda na execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, por todo auxílio prestado durante a execução deste e dos demais projetos de nosso grupo, e pelo trabalho em conjunto no Projeto Temático da FAPESP (2017/04138-8).

Às professoras Sandra Bosco, Cláudia Rainho, Marjorie Golim, Terezinha Peraçoli e Flávia Delella, ao professor Luiz Chuffa, e aos alunos Jéssica Chechi, João Henrique, Aline, Rodrigo Lima, Mariana Romão, Priscila Rezeck, Vanessa Ribeiro, Maira Cuciolo e Luiz Lupi por todo auxílio carinhoso prestado durante o desenvolvimento dos experimentos.

A todos os professores, funcionários, graduandos e pós-graduandos do Setor de Microbiologia e Imunologia pelo auxílio e pelo companheirismo durante estes 9 anos de trabalho conjunto.

Ao Conselho de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pelos debates durante as reuniões e por todo empenho em manter o nível de excelência de nosso programa de pós-graduação. Agradecimento especial a Ana Carolina Camargo pelo companheirismo durante nosso mandato como representantes discentes.

Aos docentes, funcionários e estudantes do Instituto de Biociências de Botucatu, pela minha formação pessoal e profissional, pelo carinho e respeito com o qual sempre fui tratada. O IB sempre será a minha casa.

Aos meus pais, por todo esforço comprometido na construção e suporte de nossa família, e pela superação dos momentos mais difíceis. Espero honrar a excelente criação que vocês me deram.

À minha parceira Chris Fiorato, pelo seu amor e compreensão, e por me ajudar a sobreviver (com o mínimo de sanidade) neste país maluco.

Aos amigos-irmãos Andrei, Ana Liz, Nina, Ju e Marina, pelo companheirismo e colo de sempre.

Às minhas irmãs de coração Fernanda Helena, Katiane Reis e Marília Quinalha pela luta e fortaleza para superar todas as adversidades da vida acadêmica e pessoal.

A todos os professores que me auxiliaram durante toda minha vida escolar e que são responsáveis por minha jornada, sendo a inspiração para que eu optasse por seguir a docência.

À CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de Doutorado (2016/09986-4) concedida para execução deste projeto.

A todos que me acompanharam ao longo da jornada. São muitos nomes e laços fortes, e as histórias compartilhadas são fantásticas. Obrigada por tudo!

*“Eu amo o Brasil, mas odeio que o
capitalismo e seus apoiadores no governo
brasileiro privilegiam o lucro em detrimento das
pessoas”*

ANGELA DAVIS

Lista de Abreviaturas e Siglas

17 β -HSD: 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 β -Hidroxisteróides Desidrogenase)

ABCG2: ATP-Binding Cassette Transporter G2 (Transportador de Cassete de Ligação de ATP)

APC: Antigen-Presenting Cell (Célula Apresentadora de Antígeno)

CAPE: Caffeic Acid Phenethyl Ester (Cafeato de Feniletila)

CCL: Chemokine Ligand (Ligante de Quimiocina)

DC: Dendritic Cell (Célula Dendrítica)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

ER: Estrogen Receptor (Receptor de Estrogênio)

EROs: Espécies Reativas do Oxigênio

FAK: Focal Adhesion Kinase (Quinase de Adesão Focal)

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor type 2 (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico do Tipo 2)

HLA: Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)

HR: Hormone Receptor (Receptor de Hormônio)

IFN- γ : Interferon-Gamma (Interferon-gama)

IGF-1: Insulin-Like Growth Factor – 1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do Tipo 1)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

JAK/STAT: Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (Transdutor do Quinase-Sinal de Janus e Ativador da Transcrição)

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno)

MMP: Matrix Metalloproteinase (Metaloproteinase de Matriz)

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazolina

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B (Fator Nuclear Kappa B)

NK: Natural Killer Cell (Célula Exterminadora Natural)

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Pattern (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PR: Progesterone Receptor (Receptor de Progesterona)

TAM: Tumor-Associated Macrophage (Macrófago Associado a Tumor)

TCR: T Cell Receptor (Receptor de Célula T)

Th: T helper Lymphocyte (Linfócito T auxiliar)

TLR: Toll-like Receptor (Receptor do tipo Toll)

TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

Resumo

Câncer é um grupo de doenças que atingem pessoas em todo o mundo, causando milhões de morte anualmente. Docetaxel (DTX) é uma das abordagens terapêuticas mais utilizadas contra cânceres de mama. Todavia, quimioterápicos podem apresentar efeitos colaterais, tais como toxicidade e imunossupressão, podendo levar ao aparecimento de infecções. Para minimizar os efeitos colaterais causados pela quimioterapia, tem-se investigado a associação entre quimioterápicos e produtos naturais. Própolis é um produto apícola que apresenta muitas atividades farmacológicas. Neste trabalho, investigamos a ação citotóxica e imunomoduladora de uma associação entre extrato etanólico de própolis (EEP) e docetaxel (DTX) sobre a linhagem celular MCF-7 de câncer de mama e sobre monócitos obtidos de mulheres saudáveis. O potencial citotóxico da combinação EEP+DTX sobre a linhagem MCF-7 e monócitos foi verificado por ensaio de viabilidade celular (MTT); e o tipo de morte celular (apoptose/necrose) foi avaliado por citometria de fluxo. Os efeitos de EEP, DTX e EEP+DTX sobre a migração e invasão das células MCF-7 também foram investigados. A produção das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 por monócitos foi verificada por ELISA; a expressão dos marcadores celulares HLA-DR, CD80, TLR-2 e TLR-4 foi avaliada por citometria de fluxo. Também foi avaliada a atividade fungicida de monócitos contra *Candida albicans* e a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). O impacto do sobrenadante de monócitos tratados sobre a viabilidade, migração e invasão das células tumorais também foi investigado. A associação EEP (25 μ g/mL) + DTX (10 nM) potencializou a ação citotóxica do quimioterápico contra a linhagem MCF-7, induzindo morte celular por necrose e impedindo a migração dessas células. EEP+DTX não afetou a viabilidade de monócitos humanos, estimulou a expressão de HLA-DR, a produção de TNF- α e IL-6, restaurou a atividade candidacida e reduziu o estresse oxidativo dos monócitos. Tais resultados indicam que EEP em combinação com baixas concentrações de DTX afetou a viabilidade e migração de células MCF-7 *in vitro*, e favoreceu alguns parâmetros imunológicos relacionados às funções dos monócitos. Estes são achados novos e relevantes que merecem mais investigações devido às suas implicações práticas, a fim de propor uma nova abordagem terapêutica na Medicina Alternativa e Complementar para pacientes oncológicos.

Palavras-chave: própolis, docetaxel, câncer de mama, imunomodulação

Abstract

Cancer widely affects the world population, with millions of deaths registered annually. Docetaxel (DTX) is one of the therapeutic approaches against breast cancer. Nevertheless, chemotherapy may exert side effects like toxicity and immunosuppression, leading to infections. In an attempt to reduce the adverse effects caused by chemotherapy, the dual application of medicines and natural products has been investigated. Propolis is made by honeybees showing many pharmacological properties. In this study, we investigated the cytotoxic and immunomodulatory effects of the ethanolic extract of propolis (EEP) in combination with DTX on breast cancer MCF-7 cells and on monocytes from healthy female blood donors. The cytotoxic potential of EEP+DTX was assessed by MTT assay and the type of tumor cell death (apoptosis/necrosis) was evaluated by flow cytometry. The effects of EEP, DTX and their combination on the migration and invasion of MCF-7 cells were observed. Cytokine production (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-10) by monocytes was assessed by ELISA; the expression of cell surface markers (HLA-DR, CD80, TLR-2 and TLR-4) was verified by flow cytometry. We also investigated the fungicidal activity of monocytes against *Candida albicans* and reactive oxygen species (ROS) generation. Finally, the impact of the supernatants of treated monocytes in the viability, migration and invasiveness of tumor cells was assessed. EEP (25 μ g/mL) + DTX (10 nM) enhanced the cytotoxic action of DTX alone against MCF-7 cells by inducing necrosis and inhibiting their migratory ability. EEP+DTX exerted no cytotoxic action in monocytes and stimulated HLA-DR expression, TNF- α and IL-6 production, exerted an immunorestorative action in the fungicidal activity and reduced the oxidative stress of monocytes. Data indicated that EEP in combination with lower concentrations of DTX affected the viability and migration of MCF-7 cells *in vitro*, and improved some immunological parameters related to monocyte functions. This is a new and relevant finding that deserves further investigation due to its practical implications, proposing a new therapeutic approach for oncologic patients in Complementary and Alternative Medicine.

Keywords: propolis, docetaxel, breast cancer, immunomodulation

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	11
1.1. Câncer de mama e quimioterapia.....	7
1.2. O papel dos monócitos na imunidade contra cânceres.....	14
1.3. Própolis.....	21
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
Referências bibliográficas.....	27
Manuscrito.....	37
Conclusão.....	67
ANEXO I	

Introdução

1. Introdução

1.1. Câncer de mama e quimioterapia

Câncer é o nome dado ao conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células capazes de invadir tecidos e órgãos, com a possibilidade de se espalharem para diversas regiões do corpo. Atinge milhões de pessoas pelo mundo, com a previsão de 22 milhões de novos diagnósticos de câncer até 2030 (BRAY, 2016).

Em fevereiro de 2020, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) lançou a publicação “Estimativa 2020 – Incidência de Câncer no Brasil”, na qual há informações sobre as taxas de incidências dos diferentes tipos de cânceres no Brasil para o triênio 2020–2022. Para cada ano do triênio é estimada a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer. Exceto o câncer de pele não melanoma, os cânceres mais incidentes serão os de próstata nos homens (29,2%) e de mama nas mulheres (29,7%), sendo este último predominante nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (Figura 1) (INCA, 2019).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Estimativa para 2020 dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2019.

O número de casos de câncer de mama previstos para cada ano do triênio é de 66.280, com risco estimado de 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres. O câncer de mama, assim como no Brasil, é o mais incidente no mundo entre as mulheres. Cerca de 2,1 milhões de novos casos ocorreram em 2018, sendo equivalente a 11,6% de todos os cânceres estimados, correspondendo a um risco de 55,2 casos a cada 100 mil. Embora sua incidência independa da condição socioeconômica de cada país, foi observado um declínio em alguns países desenvolvidos, atribuído à diminuição do tratamento de reposição hormonal pós-menopausa (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018; INCA, 2019). Todavia, o comprometimento causado por esse câncer muito se deve ao diagnóstico tardio da doença, principalmente nos

países de baixa e média renda, aumentando a morbidade e, consequentemente, comprometendo a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes (INCA, 2015).

Quando nos referimos ao câncer de mama, remetemo-nos a um grupo de doenças que apresentam características moleculares próprias, variando de acordo com a complexidade genômica, alterações genéticas, resposta ao tratamento e prognóstico clínico. Dentre as possíveis classificações dos cânceres de mama, estes são comumente categorizados de acordo com a presença ou ausência de marcadores celulares para receptores de estrogênio (ER) ou progesterona (PR) e do fator de crescimento epidermal 2 (HER2). Deste modo, essas neoplasias podem ser classificadas em 4 subtipos principais: luminal A (HR+/Her2-) e luminal B (HR+/Her2+), que são positivos para a expressão de receptores de hormônios (HR), sendo estes receptores para estrogênio (ER) e/ou progesterona (PR); os Her2+, que não expressam receptores de hormônio mas expressam Her2+ (HR-/Her2+); e basal ou triplo-negativo (ER-/Her2-/PR-), os quais não expressam esses receptores (DeSANTIS *et al.*, 2019; WAKS & WINER, 2019; TSANG & TSÉ, 2020).

Para o estudo *in vitro* dos cânceres de mama, diferentes linhagens celulares têm sido utilizadas, permitindo avaliar as contribuições funcionais das anormalidades genômicas, visto que a transcrição desregulada presente nos cânceres primários humanos é conservada nas linhagens celulares. A diversidade genômica e biológica também pode ser utilizada para identificar características moleculares que podem predizer ou indicar a via de ação de agentes terapêuticos (NEVE *et al.*, 2006). As linhagens celulares de carcinomas mamários podem ser derivadas de várias fontes, incluindo derrames pleurais (MDA.MB.231 e MCF-7), tumores de mama primários (SUM149 e SUM159), recorrências de tumor primário (SUM225), e nódulos metastáticos xenoenxertados (SUM1315). A maior parte dos estudos realizados com linhagens celulares de câncer de mama relatam a utilização de 2 linhagens principais: MCF-7 e MDA.MB.231 (LACROIX & LECLERCQ, 2004).

A popularidade da utilização de células MCF-7 na pesquisa sobre câncer de mama se deve à alta expressão do receptor de estrogênio alfa (ER- α), assemelhando-se à maioria dos cânceres humanos invasivos (LEE *et al.*, 2015). Enquanto os cânceres de mama triplo-negativos apresentam os piores prognósticos, os cânceres que expressam o ER+ apresentam as melhores taxas de sobrevivência, devido à sua resposta às terapias hormonais (DeSANTIS *et al.*, 2016). A terapia hormonal para câncer de mama avançou muito após a descoberta do papel do tamoxifeno, na década de 60, como potente tratamento para câncer de mama avançado em mulheres pós-menopausa (JORDAN, 2007). Além de terapia hormonal para as pacientes que possuem receptores hormonais positivos (ER e PR), os médicos podem decidir por incluir

regimes de quimioterapia adjuvante ao tratamento em casos de cânceres precoces. Dentre essas possibilidades, os regimes envolvendo docetaxel associado à ciclofosfamida têm se mostrado como uma das escolhas razoáveis para pacientes de alto risco, considerando-se a toxicidade causada (WAKS & WINER, 2019).

O docetaxel é um quimioterápico da família dos taxanos, semi-sintetizado a partir de um precursor taxoide inativo, a 10-diacetil bacatina III, extraída da árvore da espécie *Taxus baccata*, popularmente conhecida como teixo europeu. As estruturas moleculares determinantes para a atividade do docetaxel são a cadeia lateral na posição C-13 e o sistema de anel taxana (Figura 2) (ABAL *et al.*, 2003; MONTERO *et al.*, 2005).

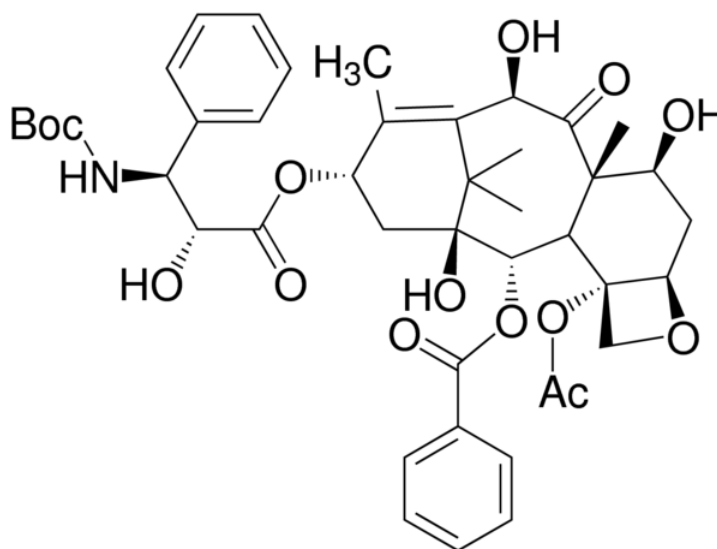


Figura 2. Fórmula química do docetaxel ($C_{43}H_{53}NO_{14}$). Fonte: PubChem.

O docetaxel atua se ligando à β -tubulina, interrompendo a dinâmica dos microtúbulos no citoplasma. Os microtúbulos estão envolvidos nos movimentos celulares e nas mudanças organizacionais que ocorrem durante o ciclo celular. Alterando a dinâmica dessas estruturas, as taxanas podem afetar a formação do fuso mitótico, agindo sobre a segregação dos cromossomos e realização da mitose, levando ao dano do DNA e bloqueando a progressão do ciclo celular. Assim, o docetaxel pode causar a inibição da divisão celular e, consequentemente, a proliferação celular em tumores. Além destes efeitos, age sobre um grande número de vias que levam à apoptose durante o tratamento (ABAL *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ-VARGAS *et al.*, 2007).

Na linhagem MCF-7, o docetaxel atua na morte celular por meio de duas maneiras: em altas concentrações, o fármaco induz parada na divisão celular, seguida de apoptose. Em baixas

concentrações, o docetaxel não induz apoptose, mas sim a catástrofe mitótica, seguida de necrose (HERNÁNDEZ-VARGAS *et al.*, 2007). Tal evento é caracterizado pela indução de divisão mitótica aberrante ou perda da segregação dos cromossomos, seguida de divisão celular. Em volta dos cromossomos formam-se envelopes nucleares e múltiplos micronúcleos, comprometendo a viabilidade celular, distinguindo estas células morfológicamente de células apoptóticas (MORSE *et al.*, 2005).

Clinicamente, o docetaxel foi aprovado para utilização como terapia adjuvante em pacientes com câncer de mama precoce e de alto risco. Porém, devido à toxicidade sistêmica cumulativa apresentada depois de terapias prolongadas e baseadas em altas doses, tem-se buscado desenvolver novas terapias utilizando doses menores. O docetaxel é facilmente acumulado nas células, porém tal acúmulo não ocorre com a utilização de baixas doses (HERNÁNDEZ-VARGAS *et al.*, 2007). Todavia, o uso combinado de docetaxel com outros quimioterápicos aumenta o risco de efeitos colaterais. Como efeitos colaterais, uma significativa proporção dos pacientes tratados com docetaxel apresentaram fadiga, dor muscular e neutropenia febril. Embora raro, foi observado o desenvolvimento de tiflites em cerca de 1% dos pacientes, uma inflamação intestinal grave associada com a neutropenia, a qual pode ser fatal (SIM *et al.*, 2018). Assim, é preocupante a possível ação do quimioterápico sobre as células envolvidas na imunidade do paciente em tratamento, podendo resultar no prejuízo de suas funções contra cânceres e micro-organismos.

1.2. O papel dos monócitos na imunidade contra cânceres

No processo de metástase, as células tumorais potencialmente imunogênicas podem ser expostas às células envolvidas na imunidade, que poderão reconhecê-las e tentarão restringir sua instalação e crescimento em outros tecidos. Todavia, tal processo pode ser prejudicado pelo desenvolvimento de mecanismos de escape da célula tumoral, evitando assim a ação do sistema imunológico (KITAMURA *et al.*, 2015). Dentre as células do sistema imune atuantes contra o câncer, tem sido demonstrada a importante participação de monócitos e/ou macrófagos e linfócitos T no controle da angiogênese, metástase e invasão tumoral (CHITTEZHATH *et al.*, 2014; SALMON *et al.*, 2019).

Monócitos constituem uma população de leucócitos mononucleares que se desenvolvem na medula óssea a partir de monoblastos e são liberados na corrente sanguínea, podendo adentrar nos tecidos, nos quais suas características e funções serão determinadas de acordo com o microambiente (LEE *et al.*, 2013). Monócitos representam 10% dos leucócitos no sangue

humano, estando presentes também em outros mamíferos, aves, anfíbios e peixes. Têm importante papel na manutenção da homeostase, por removerem células apoptóticas e componentes tóxicos. Em mamíferos, monócitos também representam o elo entre a defesa inata contra micro-organismos e a resposta imune adaptativa (AUFFRAY *et al.*, 2009).

Para o início de uma resposta imunológica, faz-se necessário o reconhecimento de antígenos. Dentre os vários receptores expressos na superfície de monócitos que podem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), damos destaque a dois deles: os receptores TLR-2 e TLR-4. A estimulação de diferentes TLRs por componentes microbianos induz ativação de diferentes fatores de transcrição e expressão gênica de citocinas, que podem favorecer a imunidade inata, bem como comandar o direcionamento da imunidade antígeno-específica (AKIRA & TAKEDA, 2004).

TLR-2 é essencial para o reconhecimento de lipopeptídeos de vários micro-organismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, micoplasma, micobactérias e espiroquetas (TAKEDA *et al.*, 2002). TLR-4 está relacionado ao reconhecimento de LPS de bactérias Gram-negativas. Além de componentes bacterianos, estes receptores também reconhecem componentes presentes em fungos: TLR-2 é responsável pelo reconhecimento de β -glucana e fosfolipomanana, e TLR-4 reconhece mananas (moléculas de superfície de fungos, como o gênero *Candida*) (NETEA *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009; BOURGEOIS & KUHLER, 2012). Após o reconhecimento de antígenos presentes na superfície de *Candida albicans*, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias que serão importantes para a atuação da célula fagocítica sobre o fungo (NETEA *et al.*, 2015).

Como a ativação de receptores TLR resulta na ativação da via do NF- κ B, a crônica estimulação destes receptores está associada à inflamação e desenvolvimento de alguns tumores malignos. Polimorfismos genéticos desses receptores também estão associados ao maior risco de desenvolvimento de alguns tipos de cânceres, e o bloqueio de sua ativação em alguns casos de inflamação crônica pode apresentar benefícios terapêuticos contra o desenvolvimento de cânceres (CHOW *et al.*, 2012; MOHME *et al.*, 2017).

Após o reconhecimento de antígenos, a ativação de linfócitos T depende da interação entre moléculas coestimuladoras, como a associação entre CD28 e as moléculas da família B7 (CD80 e CD86) (WOLK *et al.*, 2000). Tais interações são importantes para a ativação dos linfócitos T, e a ausência de moléculas B7 nas células apresentadoras de antígenos (APCs) impede o reconhecimento adequado de antígenos pelo receptor de células T (TCR), levando à anergia ou morte dos linfócitos. Estímulos relacionados ao CD80 podem levar à ativação de

linfócitos Th1, favorecendo assim a resposta antitumoral. Por outro lado, estímulos associados a CD86 levam à ativação da resposta Th2 (MATTERN *et al.*, 1998; LAHAT *et al.*, 2003).

Alguns fármacos utilizados no tratamento de câncer podem atuar sobre células e funções específicas do sistema imunológico, modulando sua atividade. Como exemplo, o taxol é capaz de elevar a produção de IL-1 β por monócitos humanos, a qual pode iniciar uma resposta inflamatória contra o tumor ou impedir sua vascularização, restringindo seu crescimento, além de aumentar a capacidade fagocítica em monócitos/macrófagos (WHITE *et al.*, 1998). Por outro lado, a administração de quimioterapia também se apresenta como fator estressante para o organismo, afetando a expressão de moléculas importantes para a elaboração da resposta imunológica, como a expressão da molécula HLA-DR na superfície celular, a qual é expressa em células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, macrófagos e monócitos, e cuja função é apresentar os antígenos processados para células T CD4⁺ a fim de iniciar a resposta imune específica (PERRY *et al.*, 2003). A diminuição da expressão de HLA-DR pode estar associada ao aumento do risco de infecções hospitalares e morte em pacientes imunodeprimidos e/ou submetidos a regimes quimioterápicos (DÖCKE *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2010; HOTCHKISS *et al.*, 2013; HIGASHI *et al.*, 2015).

Por serem células circulantes, os monócitos podem atuar como adversários imunológicos contra as células tumorais que se desvincularam do tecido tumoral, interferindo, assim, no processo de metástase (MOHME *et al.*, 2017). Tal comportamento pôde ser observado em pacientes com diferentes cânceres de mama, nos quais monócitos foram recrutados para os sítios de metástase nos pulmões onde produziram citocinas como TNF- α e IFN- γ e atraíram neutrófilos, atuando contra as células tumorais de mama que poderiam aderir ao tecido pulmonar (HAGERLING *et al.*, 2019).

Embora monócitos participem da resposta imune antitumoral por meio da indução de morte celular mediada por citocinas e do processo fagocítico, há evidências de que monócitos e macrófagos também possam favorecer a progressão do tumor, contribuindo para metástase e imunossupressão, pois expressam genes relacionados ao processo de angiogênese e invasão tecidual (QIAN *et al.*, 2011; CHITTEZHATH *et al.*, 2014; HUNG *et al.*, 2018; OLINGY *et al.*, 2019).

Os estudos de Casseta *et al.* (2019) e Ramos *et al.* (2020) demonstraram que os sítios tumorais mamário e endometrial são capazes de recrutar monócitos circulantes, alterando seu perfil transcricional de modo que estas células se diferenciem em macrófagos associados a tumores (TAM). Monócitos infiltrados no sítio tumoral podem expressar fatores que podem favorecer ou dificultar a progressão tumoral, incluindo citocinas e quimiocinas. Dentre as

citocinas liberadas, destacaremos TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. A expressão de destas citocinas tem sido relacionada ao aumento da invasão tumoral e pior prognóstico (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010).

A literatura relata efeitos divergentes destas citocinas em estudos utilizando linhagens celulares e modelos animais, bem como seus diferentes papéis nos processos de imunovigilância e escape tumoral (SALAZAR-ONFRAY *et al.*, 2007). TNF- α pode aumentar a expressão de mediadores pró-tumorigênicos por células tumorais (MCF-7 e T47D), como metaloproteinases de matriz (MMP2 e MMP9), assim como a liberação de quimiocinas que atraem monócitos (BEN-BARUCH, 2003). Outros estudos indicaram que a ação do TNF- α pode variar entre essas linhagens tumorais, embora tanto MCF-7 quanto T47D sejam responsivas a estrogênio. Em células MCF-7, o tratamento com TNF- α induziu apoptose, enquanto que, em células T47D, promoveu proliferação celular (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010). TNF- α também pode induzir a expressão de quimiocinas (CCL5 e CCL2) em diferentes linhagens de carcinoma de mama, e níveis elevados de quimiocinas podem recrutar células inflamatórias (como monócitos), resultando num círculo vicioso de infiltração contínua e expressão de fatores pró-malignos como citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e enzimas de degradação da matriz extracelular, como metaloproteinases de matriz. Tais produtos podem favorecer a angiogênese e a perda da arquitetura do tecido, resultando na migração e invasão celular, determinando um papel-chave desses monócitos infiltrantes na metástase do câncer de mama, favorecendo assim a progressão da doença (BEN-BARUCH, 2003; ENGBLOM *et al.*, 2016; CASSETTA *et al.*, 2019).

Em estudos *in vivo*, quando administrado diretamente sobre os tumores de camundongos, TNF- α inibiu o crescimento do tumor e metástase. Assim, demonstrou-se que altas doses de TNF- α podem apresentar potencial antitumorigênico, levando, contudo, à toxicidade sistêmica. Em seres humanos, o tratamento com perfusão de TNF- α sobre sarcomas em pernas e braços e melanomas foi aprovado na Europa, resultando no efeito antitumoral pela destruição da vasculatura que alimentava os tumores. Todavia, em amostras de câncer de mama humana, elevadas concentrações de TNF- α foram associadas ao aumento de metástases nos linfonodos e, conseqüentemente, à evolução do estágio tumoral (AGGARWAL, 2003; GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010).

Além destes resultados, TNF- α também induz maior expressão e atividade de ABCG2 - transportador associado à resistência das células tumorais aos quimioterápicos. Tal efeito também foi atribuído à presença de IL-1 β (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010).

IL-1 β é uma citocina que também apresentou efeitos controversos em ensaios biológicos. Esta citocina pode diminuir a proliferação de células endoteliais e inibir a angiogênese (WHITE *et al.*, 1998). Por outro lado, é uma citocina que tem sido encontrada em tecidos de câncer de mama humanos, sendo expressa pelas células tumorais ou por células associadas ao ambiente tumoral. A presença de IL-1 β , bem como de seu receptor solúvel (IL-1R), pode atuar sobre a produção de outras citocinas pró-tumorigênicas, como IL-8, contribuindo para angiogênese, proliferação e invasão. Todavia, as vias de sinalização associadas à família IL-1 podem ser diferentes em células ER⁺ (MCF-7) e em células ER⁻ (MDA-MB231) (NICOLINI *et al.*, 2006).

A produção elevada de IL-1 β é frequentemente associada a prognósticos negativos em pacientes com cânceres de mama. Em ensaios *in vitro*, foi demonstrado que esta citocina está associada à migração de células MCF-7, ao agir sobre a fosforilação da proteína cinase de adesão focal (FAK) e expressão de MMP-9. Também foi demonstrado que a elevada presença de IL-1 β atrai células mieloides supressoras que são capazes de suprimir células T CD4⁺ e CD8⁺, inibindo a resposta imune contra tumores (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010).

Outra citocina que possui atividades controversas sobre tumores é a IL-6. Em relação aos mecanismos imunológicos, a IL-6 se mostra necessária na resposta contra patógenos, na atração de leucócitos para sítios inflamatórios, ativação e diferenciação de linfócitos T e macrófagos, e para a produção de proteínas inflamatórias de fase aguda em resposta à lesão tecidual. Pela indução da diferenciação de linfócitos T e do estímulo da citotoxicidade dessas células, a IL-6 demonstra atividade antitumoral (NICOLINI *et al.*, 2006). Porém, essa citocina tem sido encontrada em altas concentrações em amostras de câncer de mama, e acredita-se que seja produzida por fibroblastos, macrófagos e linfócitos Th2 associados ao tumor. Sua presença tem sido associada à proliferação tumoral e resistência ao tratamento quimioendócrino – aquele com associação entre medicamentos quimioterápicos e agonistas hormonais. Uma das possíveis vias de atuação da IL-6 consiste no aumento da produção da enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo I (17 β -HSD), responsável por converter estrona (E1) a estradiol (E2) - forma biologicamente ativa do estrogênio. Tal hormônio atua sobre as células tumorais responsivas a estrogênio presentes no tecido mamário, induzindo sua proliferação (CONZE *et al.*, 2001; HONMA *et al.*, 2002; NICOLINI *et al.*, 2006; KNUPFER & PREIB, 2007; GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010). A IL-6 também pode aumentar a motilidade das células tumorais por mecanismos possivelmente relacionados à diminuição de E-caderina e subsequente diminuição da adesão celular, favorecendo assim a invasividade de células MCF-7 (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010). Esta citocina também exerce seus efeitos por

meio da ativação de vias de sinalização (JAK/STAT e MAPkinase) resultando na regulação transcricional de genes envolvidos na proliferação celular, sobrevivência e diferenciação (NICOLINI *et al.*, 2006).

As células tumorais também podem secretar IL-6, cujos níveis *in vitro* variam de acordo com as características moleculares das linhagens tumorais. Como exemplo, células ER- (MDA-MB231) secretam mais IL-6 que células ER+ (MCF-7) (GOLDBERG & SCHWERTFEGGER, 2010).

Tais contradições sobre a atividade da IL-6 em cânceres de mama são respaldadas por diversos trabalhos da literatura. Como revisto em KNUPFER & PREIB (2007), alguns trabalhos realizados em amostras de tecido mamário não indicam associação entre IL-6 e câncer de mama, enquanto outros indicam prognósticos positivos ou negativos. Esses dados precisam ser interpretados com cautela, pois os resultados parecem ser opostos. Mas a maioria dos trabalhos indicam que a maior concentração de IL-6 no soro de pacientes com câncer está associada a pior prognóstico.

A ação antitumoral das citocinas mencionadas foi demonstrada em ensaios *in vitro*. Nesses ensaios, as citocinas atuaram sobre as células tumorais pela inibição do receptor para o fator de crescimento IGF-1, que é altamente expresso em células MCF-7, e capaz de estimular a síntese de DNA. TNF- α , IL-1 β e IL-6 reduziram a capacidade de IGF-1 induzir a síntese de DNA nestas células, impedindo sua entrada na fase S do ciclo celular, inibindo a proliferação de células MCF-7. Também nesse trabalho, as citocinas não foram citotóxicas para as células tumorais, mas o TNF- α induziu maior susceptibilidade à fragmentação do DNA (SHEN *et al.*, 2002; KNUPFER & PREIB, 2007).

Assim como as citocinas apresentadas acima, a IL-10 apresenta resultados conflitantes quanto à sua atuação em pacientes oncológicos. Esta citocina pode ser produzida por leucócitos e pelas células tumorais, e sua presença no soro de pacientes foi relacionada tanto a prognósticos negativos para os estágios tardios da doença, devido à sua ação imunossupressora (KOVACS, 2010; LIPPITZ, 2013) quanto a prognósticos positivos em pacientes com cânceres precoces, devido à sua ação anti-inflamatória, que pode contribuir para a progressão tumoral (AHMAD *et al.*, 2018).

As características ambíguas das citocinas no microambiente tumoral demonstram que a atuação de algumas células imunes, como os monócitos, sobre o sítio tumoral ainda não foi totalmente decifrada, envolvendo vários fatores, como o estágio tumoral e o microambiente, e os diversos mediadores que podem ser produzidos (ENGBLOM *et al.*, 2016). Deste modo, diferentes terapias utilizadas para o tratamento de cânceres de mama podem atuar também sobre

o sistema imunológico, o que denota a importância de novas pesquisas que possam contribuir nesse contexto.

A atividade fagocítica de células do sistema imune é importante para a eliminação de células tumorais e também para a resposta imune do hospedeiro, principalmente na resposta contra agentes patogênicos, como bactérias e fungos, que podem ser causadores de infecções oportunistas (FENG *et al.*, 2019). A atividade fagocítica pode ser comprometida pela ação do docetaxel sobre os microtúbulos (TEOH & PAVELKA, 2016). Além deste efeito colateral específico, os tratamentos quimioterápicos também podem causar imunossupressão, acarretando diversas infecções oportunistas. Um dos agentes causadores de infecções oportunistas em indivíduos imunossuprimidos é a *Candida albicans*, que pode levar a óbito mais de 30% de indivíduos imunocomprometidos (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; NETEA *et al.*, 2008).

Em pacientes com câncer, a infecção por *C. albicans* é a mais comum. Esta espécie de fungo é comensal da espécie humana e é uma das principais espécies que colonizam a pele, as mucosas e os tratos gastrointestinal e urogenital. Pode causar infecções superficiais em indivíduos saudáveis, porém, em indivíduos imunocomprometidos, pode se tornar letal. Tal letalidade acontece por diferentes fatores, tais como a dificuldade em se estabelecer o diagnóstico da infecção, a resistência dos fungos ao tratamento, bem como a redução das respostas imunes inata e adaptativa (TEOH & PAVELKA, 2016).

O estudo de Ahmadi e colaboradores (2019) realizado em camundongos indicou que os mecanismos de escape induzidos pela infecção sistêmica por *C. albicans* podem favorecer também o crescimento do adenocarcinoma mamário. Estes mecanismos de escape estão relacionados à indução de maior produção de IL-10 pelo hospedeiro, induzindo ação anti-inflamatória. A infecção também reduz a produção de IFN- γ , responsável pela resposta Th1, a qual pode ser efetiva tanto contra a infecção patogênica quanto contra tumores. Deste modo, a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 pelos monócitos é uma importante ferramenta imunológica contra a infecção por *C. albicans*, sendo importantes para o recrutamento e ativação das células fagocíticas (NETEA *et al.*, 2015; TEOH & PAVELKA, 2016).

Fagócitos são células altamente produtoras de espécies reativas do oxigênio (EROs), que são importantes para a destruição de micro-organismos fagocitados. Todavia, a alta produção de EROs também está envolvida com mecanismos internos de lesão celular, podendo levar a célula ao colapso de suas funções (BANERJEE *et al.*, 2020). Muitas drogas quimioterápicas são fortes indutoras de produção de EROs por células e tecidos não-

neoplásicos, gerando estresse oxidativo nesses ambientes e aumentando a toxicidade colateral desses medicamentos (CHEN *et al.*, 2007; TABACZAR *et al.*, 2012; BAS *et al.*, 2019). Em macrófagos, a alta produção de EROs pode direcionar para a diferenciação dessas células em macrófagos associados a tumores de caráter anti-inflamatório e podem favorecer a progressão tumoral. Desse modo, o impedimento da produção ou da ação das EROs pode favorecer a resposta imunológica durante o tratamento contra os cânceres (ZHANG *et al.*, 2013).

Com o objetivo de potencializar os efeitos citotóxicos contra células tumorais e diminuir o impacto exercido pelos agentes antitumorais sobre o sistema imunológico, diferentes estudos têm investigado a administração concomitante de produtos naturais com quimioterápicos (AMBROZ *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Como exemplo, a associação entre resveratrol e curcumina potencializou o efeito da doxorubicina sobre células de câncer de ovário, além de atenuar o efeito cardiotoxico do quimioterápico (CARLSON *et al.*, 2014). A curcumina também promoveu melhora do efeito da cisplatina sobre células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço (DUARTE *et al.*, 2010).

Pesquisadores também têm avaliado a associação de diferentes produtos naturais como o chá verde, a quercetina, o resveratrol, a melatonina e a capsaicina ao docetaxel sobre diferentes linhagens celulares de cânceres de mama e próstata, indicando que a associação entre estes produtos potencializou a ação antitumoral do quimioterápico (WANG *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2017; ALONSO-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

1.3. Própolis

Dentre os diversos produtos naturais estudados no tratamento do câncer, a própolis tem sido considerada promissora. A própolis é produzida a partir de exsudatos e resinas, de diferentes fontes vegetais, coletados por abelhas africanizadas, além da adição de cera e secreção de suas glândulas (BURDOCK, 1998). Este produto tem sido intensamente investigado por nosso grupo de pesquisa, avaliando principalmente sua ação imunomoduladora, antitumoral e antimicrobiana (SFORCIN, 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2011; SFORCIN, 2016; RIPARI *et al.*, 2021). Diferentes amostras de própolis têm sido apontadas como agentes citotóxicos *in vitro* e quimiopreventivos contra vários tipos de cânceres *in vivo* (BANSKOTA *et al.*, 2001; ORŠOLIĆ, 2010; SEDA VATANSEVER *et al.*, 2010; WATANABE *et al.*, 2011; FRIÓN-HERRERA *et al.*, 2015; MORA *et al.*, 2019).

Dados recentes demonstraram que a amostra de própolis utilizada por nosso grupo exerceu ação citotóxica *in vitro* sobre células A549 de câncer de pulmão, induzindo apoptose e

diminuindo o potencial de membrana mitocondrial devido à superexpressão de genes pró-apoptóticos (*Bax* e *Noxa*) e redução do gene antiapoptótico *Bcl-X_L* (FRIÓN-HERRERA *et al.*, 2015). O mesmo extrato hidroalcolico de própolis também exerceu atividade citotóxica sobre células de carcinoma de laringe humana (HEp-2), induzindo parada no ciclo celular e apoptose (SILVA *et al.*, 2017).

Alguns trabalhos indicam que a própolis apresenta potencial em melhorar a ação de agentes antitumorais, provavelmente devido a um possível efeito sinérgico. Tal potencial foi demonstrado por nosso grupo, revelando que a associação de própolis com carboplatina foi eficiente no controle da proliferação de células de osteossarcoma canino *in vitro* (BERNARDINO *et al.*, 2018). Em ensaios *in vivo* com ratas que desenvolveram câncer de mama também foi observado a contribuição da própolis em potencializar a ação do paclitaxel, induzindo ação antioxidante e protegendo o organismo de efeitos colaterais induzidos pela terapia (PADMAVATHI *et al.*, 2006).

Componentes isolados da própolis também podem exercer citotoxicidade *in vitro*. Como demonstrado por Silva e colaboradores (2017), o ácido cafeico também apresentou efeito citotóxico contra a linhagem celular HEp-2. Um componente similar, o cafeato de feniletila (CAPE) também apresentou atividade citotóxica contra células tumorais da linhagem MCF-7, e sua associação ao tamoxifeno potencializou o efeito deste quimioterápico (MOTAWI *et al.*, 2016).

Além disso, um produto das abelhas sem ferrão – a geoprópolis – associado a diferentes quimioterápicos (carboplatina, metotrexato e doxorrubicina) contra células HEp-2, também apresentou resultados promissores, exercendo maior citotoxicidade sobre as células tumorais em comparação a estes tratamentos isoladamente (BARTOLOMEU *et al.*, 2016). Adicionalmente a este trabalho, a atividade da combinação de geoprópolis + doxorrubicina em monócitos humanos foi avaliada por nosso grupo. Os dados obtidos demonstraram que a combinação não foi citotóxica para monócitos humanos, possuindo ação imunomoduladora sobre estas células. Além disso, a adição da geoprópolis impediu a redução do potencial microbicida e produção de espécies reativas do oxigênio exercida pela doxorrubicina (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A própolis também apresenta atividade moduladora da resposta imune antitumoral. Células *natural killer* (NK) de ratos tratados com própolis apresentaram maior atividade citotóxica sobre células tumorais Yac-1 (SFORCIN *et al.*, 2002). A própolis estimulou também a produção de citocinas pró-inflamatórias por animais portadores de melanoma e que foram submetidos a estresse crônico, favorecendo a ativação da resposta imune celular antitumoral

(MISSIMA *et al.*, 2009). Em camundongos com metástases originadas de carcinoma mamário, a própolis e alguns de seus componentes (ácido cafeico, CAPE e quercetina) atuaram sobre os sítios metastáticos reduzindo o número de nódulos, além de ativarem a produção de espécies reativas do oxigênio e IL-1 β por macrófagos, o que contribuiu para a ação imunológica contra o tumor (ORŠOLIĆ *et al.*, 2004). A administração de própolis iraniana para camundongos com câncer de mama e candidíase disseminada demonstrou que o apiterápico atuou contra o tumor e contra a infecção fúngica por meio da produção de TNF- α e IFN- γ (KHOSRAVI *et al.*, 2014).

Analisando seu efeito sobre células humanas envolvidas na imunidade como monócitos e células dendríticas, a própolis apresentou potencial modulador sobre os eventos iniciais da resposta imune (BÚFALO *et al.*, 2014; CONTI *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2016; SFORCIN, 2016). Muitas destas funções estão diretamente relacionadas a seus componentes fenólicos, dos quais destacam-se os ácidos derivados do ácido cinâmico: ácido cafeico, ácido dihidrocinâmico e *p*-cumárico (BÚFALO *et al.*, 2013; CONTI *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2017)

Assim, os dados obtidos por nosso grupo e por demais pesquisadores têm demonstrado que a própolis apresenta-se como um produto com propriedades antitumoral e imunomoduladora, podendo ser utilizada em estudos que objetivam o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer. Neste cenário, nosso grupo também tem investigado a ação de combinações entre a própolis ou geoprópolis e quimioterápicos sobre linhagens tumorais. Além disso, temos investigado a ação imunomoduladora destas combinações sobre monócitos humanos, que são células circulantes do sangue periférico e expostas aos quimioterápicos, a fim de compreendermos a ação da própolis sobre células de defesa expostas a quimioterápicos.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo de nosso trabalho foi investigar a ação da combinação entre própolis (EEP) e o quimioterápico docetaxel (DTX) sobre a linhagem celular MCF-7 e sobre monócitos humanos, visando desenvolver uma associação que seja capaz de combater as células tumorais, agindo citotoxicamente sobre essa linhagem tumoral e modulando o papel de monócitos, sem prejuízo das funções de células envolvidas na resposta imune.

2.2. Objetivos específicos

Neste trabalho, buscou-se investigar o efeito da combinação entre própolis e docetaxel (EEP+DTX) nos seguintes parâmetros:

- ✓ Viabilidade celular da linhagem de câncer de mama (MCF-7), pelo ensaio de MTT.
- ✓ Determinação do tipo de morte celular (apoptose ou necrose) desencadeada pelo tratamento com a combinação EEP+DTX sobre a linhagem tumoral MCF-7, por citometria de fluxo.
- ✓ Expressão de marcadores celulares (TLR-2, TLR-4, HLA-DR e CD80), por citometria de fluxo, a fim de verificar se a combinação EEP+DTX pode influenciar o reconhecimento e apresentação de antígenos.
- ✓ Produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) que possuem papel na inibição e/ou progressão tumoral, por ensaio imunoenzimático (ELISA).
- ✓ Atividade fungicida de monócitos contra *Candida albicans*, no intuito de analisar se a combinação EEP+DTX pode afetar a atividade de monócitos contra um fungo presente na microbiota humana que, em indivíduos imunossuprimidos, pode causar infecção oportunista.
- ✓ Produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) por monócitos, com o objetivo de verificar o potencial antioxidante da combinação.

- ✓ Influência do sobrenadante da cultura de monócitos tratados com a combinação EEP+DTX sobre a viabilidade, migração e invasão celular da linhagem tumoral MCF-7. Com estes ensaios, verificamos como a associação EEP+DTX poderia interferir na ação dos monócitos sobre o microambiente tumoral.

Após as referências bibliográficas, encontra-se redigido o manuscrito a ser submetido à publicação junto a *British Journal of Pharmacology*, intitulado “Brazilian green propolis improves docetaxel cytotoxic effects on breast cancer MCF-7 cells and exerts an immunomodulatory action in women monocytes”.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

- ABAL, M.; ANDREU, J. M.; BARASOAIN, I. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. **Current Cancer Drug Targets**, v. 3, n. 3, p. 193-203, 2003.
- AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.
- AHMAD, N.; AMMAR, A.; STORR, S. J.; GREEN, A. R.; RAKHA, E.; ELLIS, I. O.; MARTIN, S. G. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 4, p. 537-549, 2018.
- AHMADI, N.; AHMADI, A.; KHEIRALI, E.; YADEGARI, M. H.; BAYAT, M.; SHAJIEI, A.; AMINI, A. A.; ASHRAFI, S.; ABOLHASSANI, M.; YAZDANPARAST, S. A.; MAHDAVI, M. Systemic infection with candida albicans in breast tumor bearing mice: Cytokines dysregulation and induction of regulatory t cells. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 1, p. 49-55, 2019.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.
- ALONSO-GONZÁLEZ, C.; MENÉNDEZ-MENÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, A.; COS, S.; MARTÍNEZ-CAMPA, C. Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 2, p. 560-570, 2018.
- 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.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 669-692, 2009.
- BANERJEE, S.; GHOSH, S.; MANDAL, A.; GHOSH, N.; SIL, P. C. ROS-associated immune response and metabolism: a mechanistic approach with implication of various diseases. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 7, p. 2293-2317, 2020.
- 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.

- BAS, E.; NAZIROGLU, M. Selenium attenuates docetaxel-induced apoptosis and mitochondrial oxidative stress in kidney cells. **Anti-cancer drugs**, v. 30, n. 4, p. 339-346, 2019.
- BEN-BARUCH, A. Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 1, p. 31-36, 2003.
- BERNARDINO, P. N.; BERSANO, P. R. O.; NETO, J. F. L.; SFORCIN, J. M. Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 268-274, 2018.
- BOURGEOIS, C.; KUCHLER, K. Fungal pathogens-a sweet and sour treat for toll-like receptors. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v. 2, n. 142.10, p. 3389, 2012.
- BRAY, F. The Evolving Scale and Profile of Cancer Worldwide: Much Ado About Everything. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 1, p. 3-5, 2016.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- 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, p. 1497-1504, 2014.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.
- CARDOSO, E. O.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; CONTE, F. L.; OLIVEIRA, L. P. G.; HERNANDES, R. T.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. 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 co-delivery of resveratrol and curcumin to mitigate *in vitro* doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2315-2322, 2014.
- CASSETTA, L.; FRAGKOIANNI, S.; SIMS, A. H.; SWIERCZAK, A.; FORRESTER, L. M.; ZHANG, H.; SHOONG, D. Y. H.; COTECHINI, T.; ANUR, P.; MILLAR, E. R.; LIN, E. Y.; FIDANZA, A.; LOPEZ-YRIGOYEN, M.; MILLAR, M. R.; URMAN, A.; AI, Z.; SPELLMAN, P. T.; HWANG, S.; DIXON, J. M.; WIECHMANN, L.; COUSSENS, L. M.; SMITH, H. O.; POLLARD, J. W. Human tumor-associated macrophage and monocyte transcriptional landscapes reveal cancer-specific reprogramming, biomarkers, and therapeutic targets. **Cancer Cell**, v. 35, n. 4, p. 588-602. e10, 2019.

- CHEN, Y.; JUNG SUWADEE, P.; VORE, M.; BUTTERFIELD, D. A.; CLAIR, D. K. S. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. **Molecular Interventions**, v. 7, n. 3, p. 147, 2007.
- CHITTEZHATH, M.; DHILLON, M. K.; LIM, J. Y.; LAOUI, D.; SHALOVA, I. N.; TEO, Y. L.; CHEN, J.; KAMARAJ, R.; RAMAN, L.; LUM, J.; THAMBOO, T. P.; CHIONG, E.; ZOLEZZI, F.; YANG, H.; VAN GINDERACHTER, J. A.; POIDINGER, M.; WONG, A. S. C.; BISWAS, S. K. Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 815-829, 2014.
- CHOW, M. T.; MÖLLER, A.; SMYTH, M. J. Inflammation and immune surveillance in cancer. **In: Seminars in Cancer Biology. Academic Press**, 2012. p. 23-32.
- CONTI, B. J.; BÚFALO, M. C.; GOLIM, M. A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; CARDOSO, E. O.; FREIRE, P. P.; CARVALHO, R. F.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. M. Propolis modulates miRNAs involved in TLR4 pathway, NF- κ B activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1604-1612, 2016.
- CONZE, D.; WEISS, L.; REGEN, P. S.; BHUSHAN, A.; WEAVER, D.; JOHNSON, P.; RINCÓN, M. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 24, p. 8851-8858, 2001.
- DESANTIS, C. E.; MA, J.; GAUDET, M. M.; NEWMAN, L. A.; MILLER, K. D.; SAUER, A. G.; JEMAL, A.; SIEGEL, R. L. Breast cancer statistics, 2019. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 6, p. 438-451, 2019.
- DESANTIS, C. E.; FEDEWA, S. A.; SAUER, A. G.; KRAMER, J. L.; SMITH, R. A.; JEMAL, A. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 31-42, 2016.
- DÖCKE, W. D.; HÖFLICH, C.; DAVIS, K. A.; RÖTTGERS, K.; MEISEL, C.; KIEFER, P.; WEBER, S. U.; HEDWIG-GEISSING, M.; KREUZFELDER, E.; TSCHENTSCHER, P.; NEBE, T.; ENGEL, A.; MONNERET, G.; SPITTLER, A.; SCHMOLKE, K.; REINKE, P.; VOLK, H.; HUNZ, D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2341-2347, 2005.
- 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 IKK β protein of the NF κ B pathway. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, p. 2665-2675, 2010.
- ENGBLOM, C.; PFIRSCHKE, C.; PITTET, M. J. The role of myeloid cells in cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 7, p. 447, 2016.
- FENG, M.; JIANG, W.; KIM, B. Y.; ZHANG, C. C.; FU, Y. X.; WEISSMAN, I. L. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 10, p. 568-586, 2019.

- FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; DYBA, T.; RANDI, G.; BETTIO, M.; GAVIN, A.; VISSER, O.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. **European Journal of Cancer**, v. 103, p. 356-387, 2018.
- FRIÓN-HERRERA, Y.; DIAZ-GARCIA, A.; RUIZ-FUENTES, J.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, 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.
- GOLDBERG, J. E.; SCHWERTFEGER, K. L. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 9, p. 1133-1146, 2010.
- HAGERLING, C.; GONZALEZ, H.; SALARI, K.; WANG, C. Y.; LIN, C.; ROBLES, I.; van GOGH, M.; DEJMEK, A.; JIRSTRÖM, K.; WERB, Z. Immune effector monocyte–neutrophil cooperation induced by the primary tumor prevents metastatic progression of breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 43, p. 21704-21714, 2019.
- HERNÁNDEZ-VARGAS, H.; PALACIOS, J.; MORENO-BUENO, G. Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. **Oncogene**, v. 26, n. 20, p. 2902-2913, 2007.
- 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.
- HONMA, S.; SHIMODAIRA, K.; SHIMIZU, Y.; TSUCHIYA, N.; SAITO, H.; YANAIHARA, T.; OKAI, T. The influence of inflammatory cytokines on estrogen production and cell proliferation in human breast cancer cells. **Endocrine Journal**, v. 49, n. 3, p. 371-377, 2002.
- HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 862-874, 2013.
- HUNG, C. H.; CHEN, F. M.; LIN, Y. C.; TSAI, M. L.; WANG, S. L.; CHEN, Y. C.; CHEN, Y. T.; HOU, M. F. Altered monocyte differentiation and macrophage polarization patterns in patients with breast cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 366, 2018.
- JORDAN, V.C. New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. **Steroids**, v. 72, n. 13, p. 829-842, 2007.
- KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; DARVISHI, S.; TAGHAVI, M. Immunomodulatory efficacy of ethanol extract of propolis on tumor-bearing mice with disseminated candidiasis. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 24, n. 4, p. e143-e148, 2014.
- 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.

- KITAMURA, T.; QIAN, B.; POLLARD, J. W. Immune cell promotion of metastasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 73-86, 2015.
- KNÜPFER, H.; PREIß, R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 102, n. 2, p. 129-135, 2007.
- KOVACS, E. Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells?. **Leukemia Research**, v. 34, n. 7, p. 912-916, 2010.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p. 621-625, 2009.
- LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 83, n. 3, p. 249-289, 2004.
- LAHAT, N.; RAHAT, M. A.; BALLAN, M.; WEISS-CEREM, L.; ENGELMAYER, M.; BITTERMAN, H. Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF- α secretion. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 2, p. 197-205, 2003.
- LEE, A.V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N.E. MCF-7 cells - Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. 1-4, 2015.
- LEE, H.; CHOI, H.; HA, S.; LEE, K.; KWON, Y. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1835, n. 2, p. 170-179, 2013.
- LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 6, p. e218-e228, 2013.
- MATTERN, T.; FLAD, H. D.; BRADE, L.; RIETSCHER, E. T.; ULMER, A. J. Stimulation of human T lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3412-3418, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. INCA, Rio de Janeiro. 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. INCA, Rio de Janeiro. 2019.
- 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.
- MOHME, M.; RIETHDORF, S.; PANTEL, K. Circulating and disseminated tumour cells—mechanisms of immune surveillance and escape. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 3, p. 155, 2017.
- MONTERO, A.; FOSSELLA, F.; HORTOBAGYI, G.; VALERO, V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 4, p. 229-239, 2005.

- MORA, D. P. P.; SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; CARDOSO, E. O.; CONTE, F. L.; OLIVEIRA, L. P. G.; GOLIM, M. A.; URIBE, J. F. C.; GUTIÉRREZ, R. M.; BUITRAGO, M. R.; Popova, M.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GARCÍA, O. T.; SFORCIN, J. M. The chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: A comparative assessment of Colombian samples. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 3, p. 591-601, 2019.
- MORSE, D. L.; GRAY, H.; PAYNE, C. M.; GILLIES, R. J. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 10, p. 1495-1504, 2005.
- MOTAWI, T. K.; ABDELAZIM, S. A.; DARWISH, H. A.; ELBAZ, E. M.; SHOUMAN, S. A. Modulation of tamoxifen cytotoxicity by caffeic acid phenethyl ester in MCF-7 breast cancer cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-13, 2016.
- NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67-78, 2008.
- NETEA, M. G.; JOOSTEN, L. A.; VAN DER MEER, J. W.; KULLBERG, B. J.; VAN DE VEERDONK, F. L. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, 2015.
- NEVE, R. M.; CHIN, K.; FRIDLYAND, J.; YEH, J.; BAEHNER, F. L.; FEVR, T.; CLARK, L.; BAYANI, N.; COPPE, J.; TONG, F.; SPEED, T.; SPELLMAN, P. T.; DEVRIES, S.; LAPUK, A.; WANG, N. J. KUO, W.; STILWELL, J. L.; PINKEL, D.; ALBERTSON, D. G.; WALDMAN, F. M.; MCCORMICK, F.; DICKSON, R. B.; JOHNSON, M. D.; LIPPMAN, M.; ETHIER, S.; GAZDAR, A.; GRAY, J. W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 515-527, 2006.
- NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 5, p. 325-337, 2006.
- OLINGY, C. E.; DINH, H. Q.; HEDRICK, C. C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 309-322, 2019.
- OLIVEIRA, L. P. G.; CONTE, F. L.; CARDOSO, E. O.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; GOLIM, M. A.; FELTRAN, G. S.; ZAMBUZZI, W. F.; SFORCIN, J. M. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life Sciences**, v. 217, p. 81-90, 2019.
- 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, n. 12, p. 1551-1558, 2016.
- 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.; KNEŽEVIĆ, A. H.; ŠVER, L.; TERZIĆ, S.; BAŠIĆ, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 307-315, 2004.

- PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; CHODON, D.; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7, 12 dimethyl benz (a) anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 24, p. 2820-2825, 2006.
- PERRY, S. E.; MOSTAFA, S. M.; WENSTONE, R.; SHENKIN, A.; MCLAUGHLIN, P. J. Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 8, p. 1245-1252, 2003.
- QIAN, B.; LI, J.; ZHANG, H.; KITAMURA, T.; ZHANG, J.; CAMPION, L. R.; KAISER, E. A.; SNYDER, L. A.; POLLARD, J. W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 222-225, 2011.
- RAMOS, R. N.; RODRIGUEZ, C.; HUBERT, M.; ARDIN, M.; TREILLEUX, I.; RIES, C. H.; LAVERGNE, E.; CHABAUD, S.; COLOMBE, A.; TREDAN, O.; GUEDES, H. G.; LAGINHA, F.; RICHER, W.; PIAGGIO, E.; BARBUTO, J. A. M.; CAUX, C.; MENETRIER-CAUX, C.; BENDRISS-VERMARE, N. CD163+ tumor-associated macrophage accumulation in breast cancer patients reflects both local differentiation signals and systemic skewing of monocytes. **Clinical & Translational Immunology**, v. 9, n. 2, p. e1108, 2020.
- RIPARI, N.; SARTORI, A. A.; HONORIO, M. S.; CONTE, F. L.; TASCA, K. I.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 20, p. 1-19, 2021.
- SALAZAR-ONFRAY, F.; LÓPEZ, M. N.; MENDOZA-NARANJO, A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 1-2, p. 171-182, 2007.
- SALMON, H.; REMARK, R.; GNJATIC, S.; MERAD, M. Host tissue determinants of tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 4, p. 215-227, 2019.
- SÁNCHEZ, B. G.; BORT, A.; MATEOS-GÓMEZ, P. A.; RODRÍGUEZ-HENCHE, N.; DÍAZ-LAVIADA, I. Combination of the natural product capsaicin and docetaxel synergistically kills human prostate cancer cells through the metabolic regulator AMP-activated kinase. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 54, 2019.
- 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. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 8, p. 1-8, 2016.
- SEDA VATANSEVER, H. S.; SORKUN, K.; GURHAN, I. D.; OZDAL-KURT, F.; TURKOZ, E.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. **Acta Histochemica**, v. 112, n. 6, p. 546-556, 2010.
- SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy**, v. 30, p. 894-905, 2016.
- SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.

- SFORCIN, J. M.; 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.; 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.
- SHEN, W. H.; ZHOU, J. H.; BROUSSARD, S. R.; FREUND, G. G.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor. **Cancer Research**, v. 62, n. 16, p. 4746-4756, 2002.
- SILVA, L. M.; FRIÓN-HERRERA, Y.; BARTOLOMEU, A. R.; GORGULHO, C. M.; SFORCIN, J. M. Mechanisms involved in the cytotoxic action of Brazilian propolis and caffeic acid against HEp-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1625-1633, 2017.
- SIM, S.; BERGH, J.; HELLSTRÖM, M.; HATSCHEK, T.; XIE, H. Pharmacogenetic impact of docetaxel on neoadjuvant treatment of breast cancer patients. **Pharmacogenomics**, v. 19, n. 16, p. 1259-1268, 2018.
- SINGH, S. K.; BANERJEE, S.; ACOSTA, E. P.; LILLARD, J. W.; SINGH, R. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 10, p. 17216, 2017.
- TABACZAR, S.; KOCEVA-CHYLA, A.; CZEPAS, J.; PIENIAZEK, A.; PIASECKA-ZELGA, J.; GWOZDZINSKI, K. Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel in blood plasma of rats bearing mammary tumor. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 153, 2012.
- TAKEDA, K.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v. 8, p. 459-463, 2002.
- TEOH, F.; PAVELKA, N. How chemotherapy increases the risk of systemic candidiasis in cancer patients: current paradigm and future directions. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 6, 2016.
- TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular classification of breast cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2020.
- WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast cancer treatment: a review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019.
- WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D.; VADGAMA, J. V. Sensitization to docetaxel in prostate cancer cells by green tea and quercetin. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 408-415, 2015.
- 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.
- WHITE, C. M.; MARTIN, B. K.; LEE, L. F.; HASKILL, J. S.; TING, J. P. Y. Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 46, n. 2, p. 104-112, 1998.

- 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.
- WOLK, K., DÖCKE, W. D.; VON BAEHR, V.; VOLK, H. D.; SABAT, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 218-223, 2000.
- ZHANG, Y.; CHOKSI, S.; CHEN, K.; POBEZINSKAYA, Y.; LINNOILA, I., LIU, Z.. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. **Cell Research**, v. 23, n. 7, p. 898-914, 2013.

Manuscrito

Brazilian green propolis improves docetaxel cytotoxic effects on breast cancer MCF-7 cells and exerts an immunomodulatory action in women monocytes

Eliza de Oliveira Cardoso¹, Karina Basso Santiago¹, Bruno José Conti¹, Fernanda Lopes Conte¹, Karen Ingrid Tasca¹, Graziela Gorete Romagnoli², Marjorie de Assis Golim³, Cláudia Aparecida Rainho¹, Jairo Kenupp Bastos⁴, José Maurício Sforcin^{1,*}

¹Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

²Department of Health Science, Oeste Paulista University – UNOESTE, Jaú, São Paulo, Brazil

³Botucatu Blood Center, School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil

⁴Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

*Correspondence: Eliza de Oliveira Cardoso. Tel: +55 1438800445; E-mail: eo.cardoso@unesp.br; ORCID: 0000-0002-4722-3733.

Data Availability Statement

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary material.

Abstract

Docetaxel (DTX) is one therapeutic approach against breast cancer, but it may exert side effects like toxicity and immunosuppression. To reduce its adverse effects, the dual application of medicines and natural products has been studied. Here we investigated the cytotoxic and immunomodulatory effects of the ethanolic extract of propolis (EEP) in combination with DTX on breast cancer MCF-7 cells and on women's monocytes. The cytotoxic potential of EEP+DTX was assessed by MTT assay and the type of tumor cell death was evaluated by flow cytometry. The effects of EEP, DTX and EEP+DTX on the migration and invasion of MCF-7 cells were observed. Cytokine production by monocytes was assessed by ELISA; and the expression of cell surface markers was verified by flow cytometry. We also investigated the fungicidal activity of monocytes against *Candida albicans* and reactive oxygen species (ROS) generation. Finally, the impact of the supernatants of treated monocytes in the viability, migration and invasiveness of tumor cells was assessed. EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM)

enhanced the cytotoxicity of DTX alone against MCF-7 cells by inducing necrosis and inhibiting their migratory ability. EEP+DTX were safe to monocytes and stimulated HLA-DR expression, TNF- α and IL-6 production, exerted an immunorestorative action in the fungicidal activity and reduced the oxidative stress. This is a new and relevant finding that deserves further investigation due to its practical implication, proposing a new therapeutic approach for oncological patients in Complementary and Alternative Medicine.

Keywords: propolis, docetaxel, breast cancer, immunomodulation

1. Introduction

Docetaxel (DTX) is commonly used against different cancer types such as prostate, breast and small cell lung cancer. It is derived from taxanes synthesized from a 10-deacetyl baccatin III, extracted from the leaves of the European yew *Taxus baccata* (Montero et al., 2005). DTX is a β -tubulin ligand and acts by interrupting the dynamics of microtubules, damaging chromosome segregation and blocking cell cycle progression. Chemotherapy may also affect several pathways leading to apoptosis of tumor cells (Hernández-Vargas et al., 2007). However, the continuous use of high-dose DTX may cause several side effects including fatigue, neutropenia, and muscle ache (Sim et al., 2018). Due to its effect on microtubules, DTX may also harm the phagocytic activity of neutrophils and monocytes (Teoh & Pavelka, 2016).

During tumor development, some cells may be exposed to monocytes, macrophages, and lymphocytes, which may recognize and restrain tumor cell growth. Monocytes are found in the blood and act against tumor cells that have escaped from primary tumor tissue, inhibiting their metastatic dissemination (Mohme et al., 2017). In patients with breast cancer, monocytes are recruited to metastasis sites where they produce TNF- α and IFN- γ and attract neutrophils, acting against tumor cells, which may adhere to the lung tissue (Hagerling et al., 2019). Although monocytes kill tumor cells by producing cytokines and exerting phagocytosis, they may also favor tumor progression by expressing genes related to angiogenesis and tissue invasion (Hung et al., 2018).

A range of natural products has been investigated simultaneously with chemotherapy in order to increase its antitumor action and diminish side effects (Oliveira Júnior et al., 2018). Resveratrol and curcumin potentiated doxorubicin effects against ovarian cancer cells *in vitro* (Carlson et al., 2014). The effects of green tea, quercetin, melatonin and capsaicin combined to

DTX were also assessed on prostate and breast cancer cell lineages, increasing the antitumor potential of DTX (Wang et al., 2015; Singh et al., 2017; Alonso-González et al., 2018; Sánchez et al., 2019).

Among natural products assayed for cancer treatment, propolis has stood out as a promising candidate. Propolis is made by honeybees after collecting exudates and resins from different botanical sources and has been investigated due to its pharmacological properties, exhibiting antitumoral and immunomodulatory action (Sforcin, 2016). The ethanolic extract propolis (EEP) exerted a cytotoxic activity against lung cancer A549 cells and laryngeal epidermoid carcinoma HEP-2 cells by inducing apoptosis (Frión-Herrera et al., 2015; Silva et al., 2017). Propolis also enhanced the action of antitumor agents such as carboplatin against canine osteosarcoma *in vitro* (Bernardino et al., 2018), and paclitaxel against breast tumor in rats (Padmavathi et al., 2006). In addition, EEP displayed an immunomodulatory action in monocytes and dendritic cells, stimulating the initial steps of the immune response (Búfalo et al., 2014; Conti et al., 2016; Santiago et al., 2016; Sforcin, 2016). These effects seemed to be related to phenolic compounds, mainly the derivatives of cinnamic acid, such as caffeic, dihydrocinnamic and *p*-coumaric acid (Conti et al., 2013; Cardoso et al., 2017).

The aim of the present study was to investigate the effects of EEP in combination with reduced concentrations of DTX against a breast tumor cell lineage (MCF-7) to determine whether this treatment could improve the cytotoxic action of DTX. Since chemotherapy is systemically distributed and monocytes are circulating cells, the most efficient combination of EEP+DTX against MCF-7 cells was also assessed in monocytes obtained from women peripheral blood, to observe possible cell function changes.

Material and Methods

Ethanolic extract of propolis (EEP)

The hydroalcoholic extract of Brazilian propolis was prepared after grinding 30 g of propolis, adding 70% ethanol to obtain 100 mL. EEP was kept at room temperature in the dark and with moderate shaking. After 7 days, the extract was filtered and the dry weight was calculated (110 mg/mL). For each assay, the extract was diluted in DMEM or RPMI 1640 culture medium (Cultilab, Brazil) containing L-glutamine (0.1 g/L), sodium bicarbonate (2.2 g/L), non-essential amino acids (10 mL/L) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (complete DMEM or RPMI). For the assays with MCF-7 cells, the following

concentrations of EEP were used: 25; 50; 75 and 100 µg/mL, and for the immunological assays with monocytes, we used EEP 25 µg/mL (according to the most efficient cytotoxic action against MCF-7 cells in combination with DTX).

Docetaxel and combinations with EEP

DTX solution (IMA Laboratory, Argentina) containing water and 13% ethanol was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) 1000 nM and maintained at -20°C. This stock solution was diluted for the MCF-7 cell viability assay to obtain 1; 2.5; 5; 10; 25; 50; 75 and 100 nM.

To obtain the combinations EEP+DTX, the concentrations of propolis (25, 50, 75 and 100 µg/mL) were mixed with the lower concentrations of DTX that affected MCF-7 cell viability: 5, 10 and 25 nM.

MCF-7 cell culture

MCF-7 cells were obtained from the Tissue Culture Shared Resource (TCSR) at the Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University, Washington DC. Cells were grown in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM - Cultilab, Brazil) with 10% FBS, streptomycin (100 µg/mL) and penicillin (100 U/mL), and cultivated at 37°C and 5% CO₂. After growth, cells were detached using 0.2% trypsin in 5% EDTA and counted (2×10^5 cells/mL). Then, 100 µL of cell suspension was added on 96-well plates and incubated for 24 h for adherence. Thereafter, supernatants were removed and EEP, DTX and their combinations were added at the concentrations described above and the plates were incubated for 24, 48 and 72 h for the viability assay. As control, cells were treated only with DMEM medium with FBS or with the highest concentration of 70% ethanol (propolis solvent) used in the assays (0,013%).

Monocyte culture

Blood was obtained from 10 healthy female donors aged 18-50 years, non-smokers, who did not consume alcohol 24 h before blood collection nor anti-inflammatory drugs the previous week.

Blood samples were heparinized and centrifuged in Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden – density = 1.077) to obtain the peripheral blood mononuclear cells (PMBC). Monocytes were isolated using magnetic-activated cell sorting (Miltenyi Biotec Inc, USA).

Viable cells were counted using 0.2% Trypan blue staining and resuspended to a final concentration of 1×10^6 monocytes/mL in complete RPMI. The cells were treated with EEP (25 µg/mL), DTX (10 nM) and the combination of EEP+DTX for 24 h. Lipopolysaccharide (LPS, 5 µg/mL) was used as a positive control.

This study was approved by the Ethics Committee of the Botucatu Medical School, UNESP (CAAE 68218117.4.0000.5411).

Assessment of cell viability

Cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich Corporation, USA) MTT assay.

After incubation of MCF-7 cells or monocytes with the stimuli (EEP, DTX and their combinations), supernatants were removed and 100 µL of MTT (1 mg/mL) in complete medium was added to the cell cultures for 3 h. Then, MTT was removed and dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Corporation, USA) was added to dissolve the formazan salt. Absorbances were read at 540 nm and the optical density (O.D.) was used to obtain the percentages (%) of cell viability:

$$\% \text{ cell viability} = (O.D. \text{ treated cells} / O.D. \text{ control}) \times 100.$$

MCF-7 cell death type by annexin V-FITC and propidium iodide (AV/PI) staining

To determine the type of cell death (apoptosis or necrosis), the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, USA) was used according to manufacturers' guidelines. MCF-7 cells (1×10^5 cells) were seeded on 24-well plates and incubated for 24 h adherence. After, cells were treated with EEP (25 µg/mL), DTX (10 nM) and the combination EEP+DTX that demonstrated a higher cytotoxic action than DTX itself. After 24 h, cells were trypsinized and centrifuged (300 g for 10 min). Cell pellet was washed twice with PBS and incubated with annexin V and propidium iodide (PI) for 15 min in the dark at room temperature. Cells were analyzed by flow cytometer FACSCanto II (BD Biosciences, USA) and data was analyzed using the FlowJo software (BD Biosciences, USA). The percentages of apoptotic (AV+/PI-), necrotic (AV+/PI+ or AV-/PI+) and live cells (AV-/PI-) were determined.

Migration and invasion assay: effects of EEP, DTX, EEP+DTX and supernatants of treated monocytes on MCF-7 cells

First, to observe the effects of EEP and DTX directly on tumor cells migratory behavior, MCF-7 cells (1×10^5 cells) were plated in the upper chambers of 24-wells ThinCert cell culture inserts with pores (8.0 μm size) (Greiner Bio-One, Austria).

For the invasion assay, the inserts were covered with Geltrex (Gibco, USA). The cells were treated with EEP, DTX and EEP+DTX diluted in a serum free RPMI 1640 medium.

The same procedure was carried out to evaluate the effects of monocytes on the migratory and invasive ability of tumor cells, using the supernatants collected from monocyte cultures treated with EEP, DTX and their combination for 24 h. RPMI medium supplemented with 20% FBS was added in the lower well as a chemoattractant factor and the cultures were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Then, the cells in the upper chamber were removed with a cotton swab, and the cells that migrated to the lower surface of the inserts were fixed in methanol for 10 min and stained with violet crystal for a further 10 min. The migrated cells were photographed with a 200x objective in an inverted microscope (Zeiss, Germany). Four non-overlapped images were randomly analyzed for each well and the migrated cells were manually counted.

Cell markers expression

The expression of HLA-DR, CD80, TLR-2 and TLR-4 by monocytes was analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA).

After treatments with EEP, DTX and their combination for 24 h, monocytes were incubated with the following monoclonal antibodies (Biolegend, USA): anti-CD14-PercP-Cy5.5 (clone M5E2), anti-HLA-DR-FITC (clone L243), anti-CD80-PE (clone 2D10), anti-TLR-2-FITC (clone TLR2.1) and anti-TLR-4-PE (clone HTA125). Monocytes were stained and incubated at 4°C for 30 min at dark. After washing with isoton, cells were fixed with 5% *p*-formaldehyde in isoton.

Thirty thousand events were analyzed using the CellQuest Software (USA) and FlowJo vX0.7 (Becton Dickinson, USA). For each test, an autofluorescent tube, a monomarked control and FMO (Fluorescence Minus One) control were included. Gate strategy was based on size (FSC) and granularity (SSC), followed by doublets exclusion and determination of the CD14+ population. Data was presented as a percentage of cells that expressed the markers in the gated CD14-positive cells.

Cytokine production

After monocyte incubation with the stimuli for 24 h, supernatants of cell cultures were collected and used to determine IL-1 β , TNF- α (R&D Systems, USA), IL-6 and IL-10 (Biolegend, USA) production by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to manufacturers' instructions.

Capture antibodies specific to each cytokine were added to 96-well flat-bottom plates Nunc MaxiSorp (Nunc/Apogent, Thermo Fisher Scientific, USA). After overnight incubation, the plates were washed with PBS+Tween 20 (0,05%) and blocked with bovine serum albumin. Supernatants were added to the plates (100 μ L) for 2 h and, after washing, detection antibodies were added. Further washing, streptoavidin and the substrate were added, and the absorbances were determined at 450 nm.

Candidacidal activity of monocytes

After treatments with EEP, DTX and their combination for 24 h, monocytes were challenged with *Candida albicans* (SC 5314), containing 5×10^6 yeasts/mL in complete RPMI medium (ratio monocyte/yeast = 1:5). After 2 h at 37°C, supernatants were harvested and wells were washed with sterile distilled water to disrupt the monocyte membrane, releasing the yeasts due to possible phagocytosis. A volume of 10 mL was obtained for each well after washing. Twenty microliters from this volume were pipetted and plated in Sabouraud agar (Difco Laboratories, USA) in duplicate and plates were incubated at 35°C. After 24 h, colony-forming units (CFU) in the plates containing monocyte-yeast cocultures (experimental plates) were counted, and plates containing only yeasts were considered as the control (100%). The percentage of candidacidal activity was determined by the formula:

$$[1 - (\text{mean CFU of experimental plates} / \text{mean CFU of control plates})] \times 100.$$

Intracellular formation of reactive oxygen species (ROS) by monocytes

To determine the effects of the stimuli on ROS generation by monocytes, the dichlorofluorescein (DCFH-DA) detection assay was performed. Monocytes (1×10^6 cells/mL) were plated and treated for 24 h. After this period, phorbol myristate acetate (PMA - 5.3 mM) was added for 20 minutes. Culture supernatants were removed and cells were washed with PBS and centrifuged. Cells were incubated with DCFH-DA (0.5 μ M) for 45 minutes at 37°C. Finally, cells were washed, centrifuged, resuspended in isoton and marked with anti-CD14-PercP-Cy5.5

antibody (clone M5E2) for 30 min at 4°C. After washing, the cell pellet was resuspended in isoton.

DCF fluorescence intensity was analyzed using the FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer at 480 nm excitation wavelength and fluorescence emission was measured in FL-1 channel at 530 nm. Twenty thousand events were recorded for each analysis. Gate strategy was based on size (FSC) and granularity (SSC), followed by doublets exclusion and determination of the CD14⁺ population. Data was presented as median of fluorescence intensity obtained in the gated CD14-positive cells.

Effect of monocyte supernatants on MCF-7 cells

To observe a possible impact of mediators produced by monocytes incubated with EEP, DTX, EEP+DTX, LPS and medium alone (control), the supernatants of monocyte cultures were taken after 24 h and incubated with MCF-7 cells for 24, 48 and 72 h. RPMI was used as the control of viable MCF-7 cells. Cell viability was assessed by MTT assay as described above.

Statistical analysis

Poisson and Gamma Distribution test were used for nonparametric variables. For parametric variables, Analysis of Variance (ANOVA) and Dunnett's test ($P < 0.05$) were used. Data was analyzed using SAS for Windows, 9.2 version, and GraphPad Prism 5 (GraphPad San Diego, USA).

Results

EEP enhanced DTX cytotoxicity on MCF-7 cells without affecting monocyte viability

Although the assays were performed after 24, 48 and 72 h, the effects of the treatments were more prominent after 48 h in MCF-7 cells and are shown below.

DTX reduced by 56% the viability of MCF-7 cells after 48 h in a concentration-dependent manner (Figure 1A). Graphics illustrating 24 and 72 h are presented in the supplementary file.

MCF-7 cells were resistant to EEP action after 24 and 48 h (Figure 1B) and a cytotoxic action was seen only after 72 h (supplementary file). However, EEP (25 µg/mL) in combination with DTX (10 nM) exerted a higher cytotoxic effect on MCF-7 cells than DTX alone (Figure 1C). Thus, these concentrations were used in combination in the next assays because they also exerted a more efficient effect in the growth curve assay than DTX alone compared to the other combinations (data not shown).

To assess the effects of EEP+DTX on monocyte viability, cells were incubated for 24 and 48 h with the stimuli. However, we evaluated monocyte functions only after 24 h, because this period may accommodate the time lag between the addition of the variables and cell response in vitro. EEP, DTX and their combination did not affect monocyte viability after 24 h (figure 1D) nor after 48 h (supplementary file).

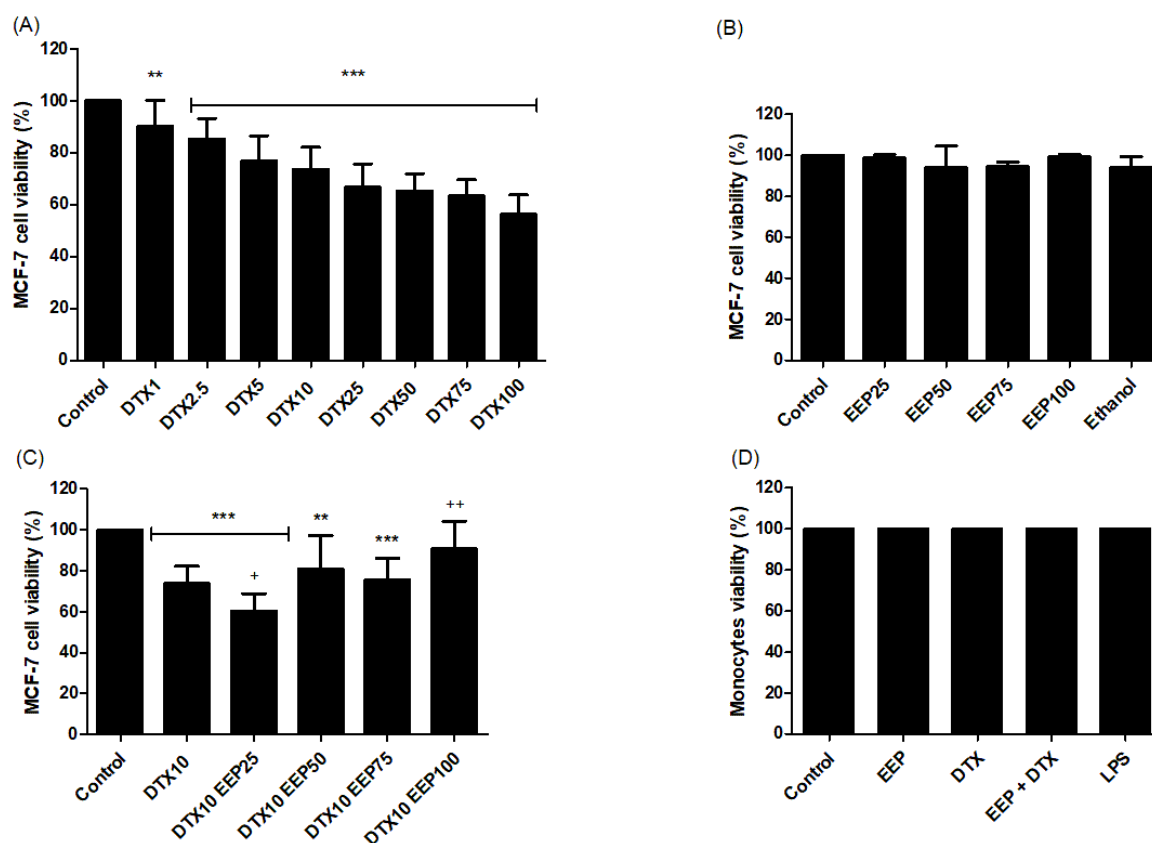


Figure 1. Viability (%) of MCF-7 cells treated with docetaxel (DTX – 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 and 100 nM) (A); propolis (EEP – 25, 50, 75 and 100 µg/mL) (B); the combination DTX (10 nM) and EEP (25 – 100 µg/mL) (C) for 48 h. Assays were performed three times in triplicate. After MCF-7 cell viability assay, monocytes were treated with EEP (25 µg/mL), DTX (10 nM), EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM), and LPS (5 µg/mL) for 24 h. Monocytes were obtained from female donors (n = 10). Data represent

mean and standard deviation. Significantly different from control: ** ($P < 0.01$); *** ($P < 0.001$). Significantly different from DTX: + ($P < 0.05$); ++ ($P < 0.01$).

EEP+DTX induced necrosis in MCF-7 cells

Since EEP+DTX reduced MCF-7 cell viability after 48 h, we classified the type of cell death only after 24 h because of the elevated percentage of dead cells after 48 h. A low percentage of apoptotic and necrotic cells was seen after 24 h, predominantly necrosis rather than apoptosis (Figure 2).

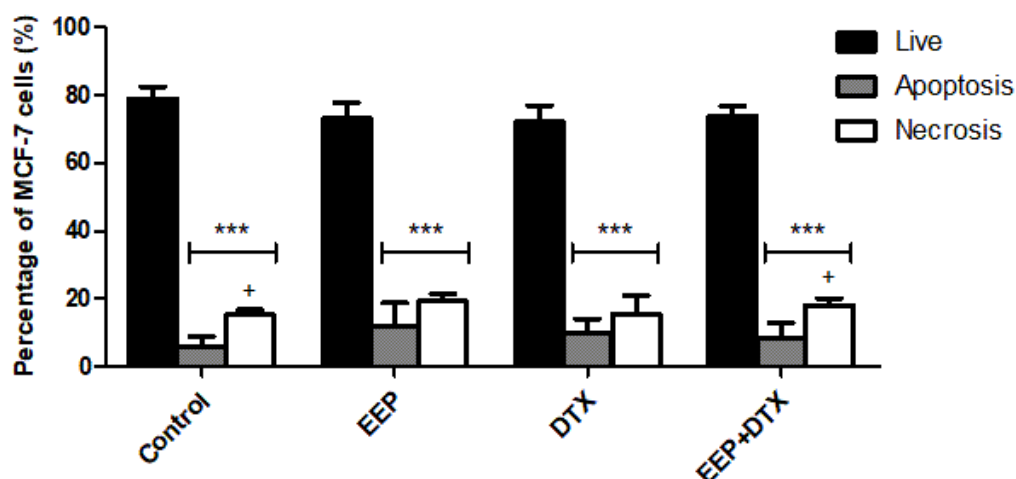


Figure 2. Percentage (%) of MCF-7 cells in apoptosis and necrosis after treatment with propolis (EEP – 25 $\mu\text{g/mL}$), docetaxel (DTX – 10 nM) and the combination EEP (25 $\mu\text{g/mL}$) + DTX (10 nM) for 24 h. Assays were performed three times in triplicates. Data represent mean and standard deviation. Significantly different from live cells: *** ($P < 0.001$). Significantly different from apoptosis: + ($P < 0.05$).

EEP+DTX impaired MCF-7 cells migration and invasiveness

DTX alone or in combination with EEP impaired the migration of breast cancer MCF-7 cells (Figure 3A). EEP did not affect the migratory ability of these cells. None of the treatments affected the invasiveness of MCF-7 cells (Figure 3B).

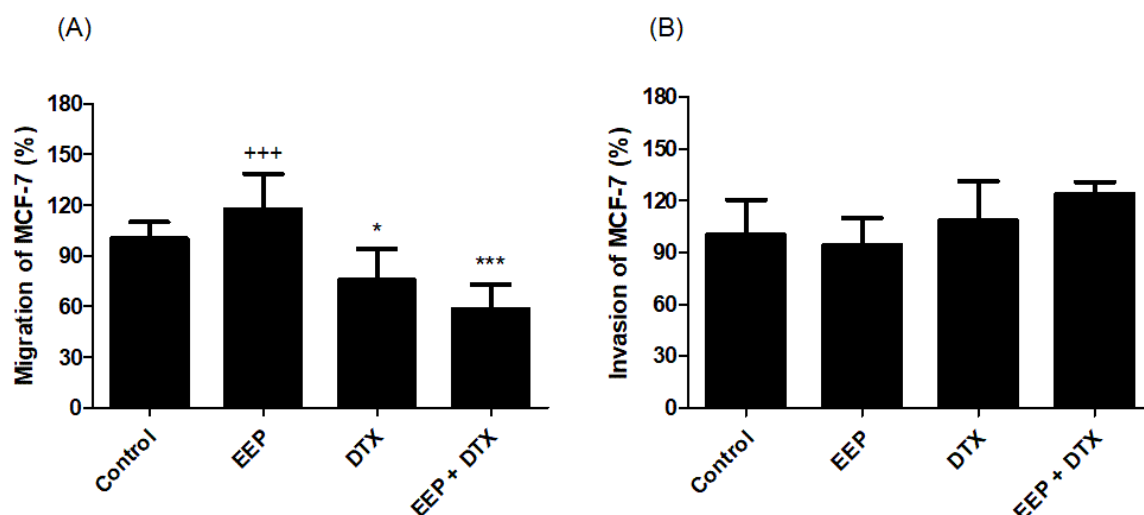


Figure 3. Percentage (%) of migration (A) and invasion (B) of MCF-7 cells treated with EEP (25 µg/mL), DTX (10 nM) and EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM) for 24 h. Assays were performed three times in triplicates. Data represent mean and standard deviation. Significantly different from control: * (P < 0.05); *** (P < 0.001). Significantly different from DTX: +++ (P < 0.001).

EEP+DTX enhanced HLA-DR⁺ monocytes and diminished CD80⁺ percentage

EEP alone and in combination with DTX stimulated HLA-DR expression in women monocytes (Figure 4A) and slightly decreased the percentage of CD80⁺ monocytes (Figure 4B). Treatments did not alter TLR-2 and TLR-4 expression compared to DTX alone (Figure 4C and 4D).

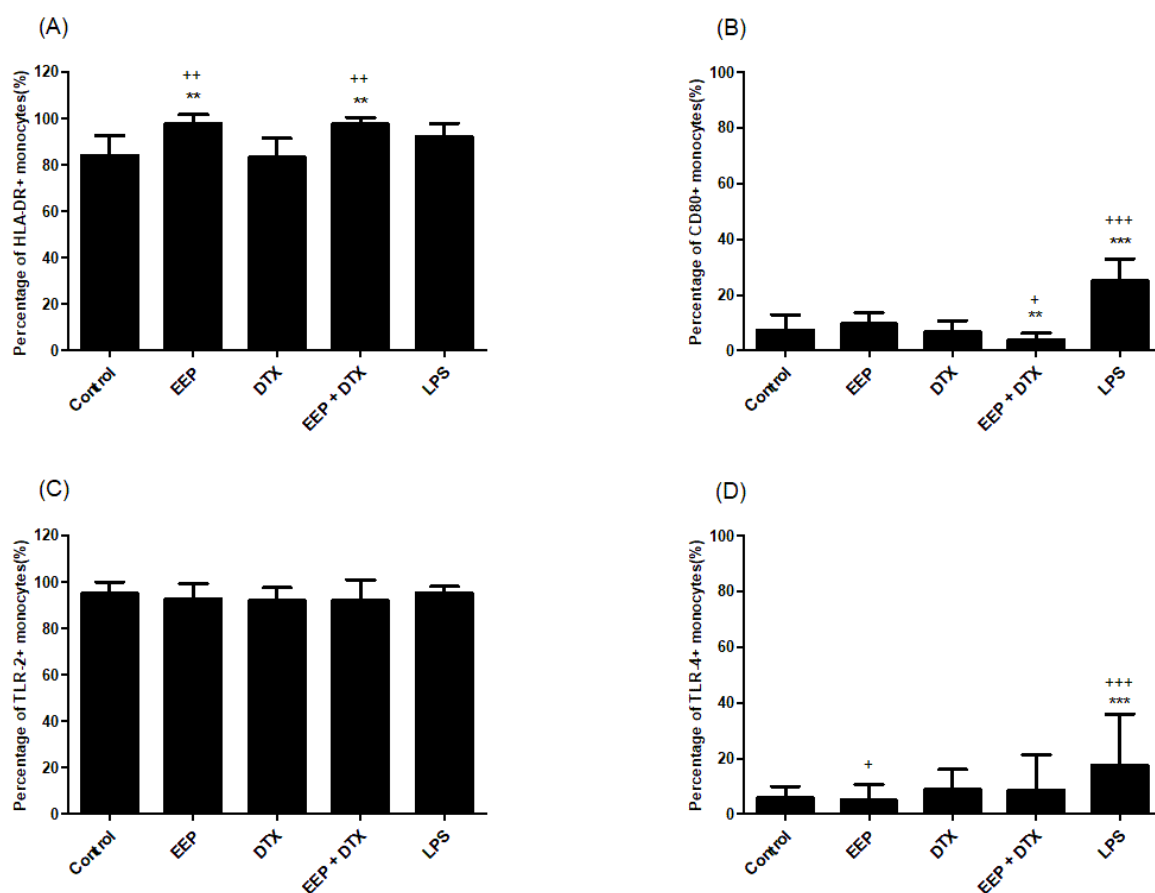


Figure 4. Percentage (%) of monocytes expressing HLA-DR (A), CD80 (B), TLR-2 (C) and TLR-4 (D) after treatment with propolis (EEP – 25 µg/mL), docetaxel (DTX – 10 nM), combination EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM), and LPS (5 µg/mL) for 24 h. Monocytes were obtained from female donors (n = 10). Data represent mean and standard deviation. Significantly different from control: ** (P < 0.01); *** (P < 0.001). Significantly different from DTX: + (P < 0.05); ++ (P < 0.01); +++ (P < 0.001).

Cytokine production by monocytes

EEP and DTX did not affect the production of IL-1 β and IL-10 by monocytes after 24 h (Figure 5A and 5D). EEP+DTX nonsignificantly stimulated TNF- α production (Figure 5B). EEP alone and in combination with DTX increased IL-6 production by these cells (Figure 5C).

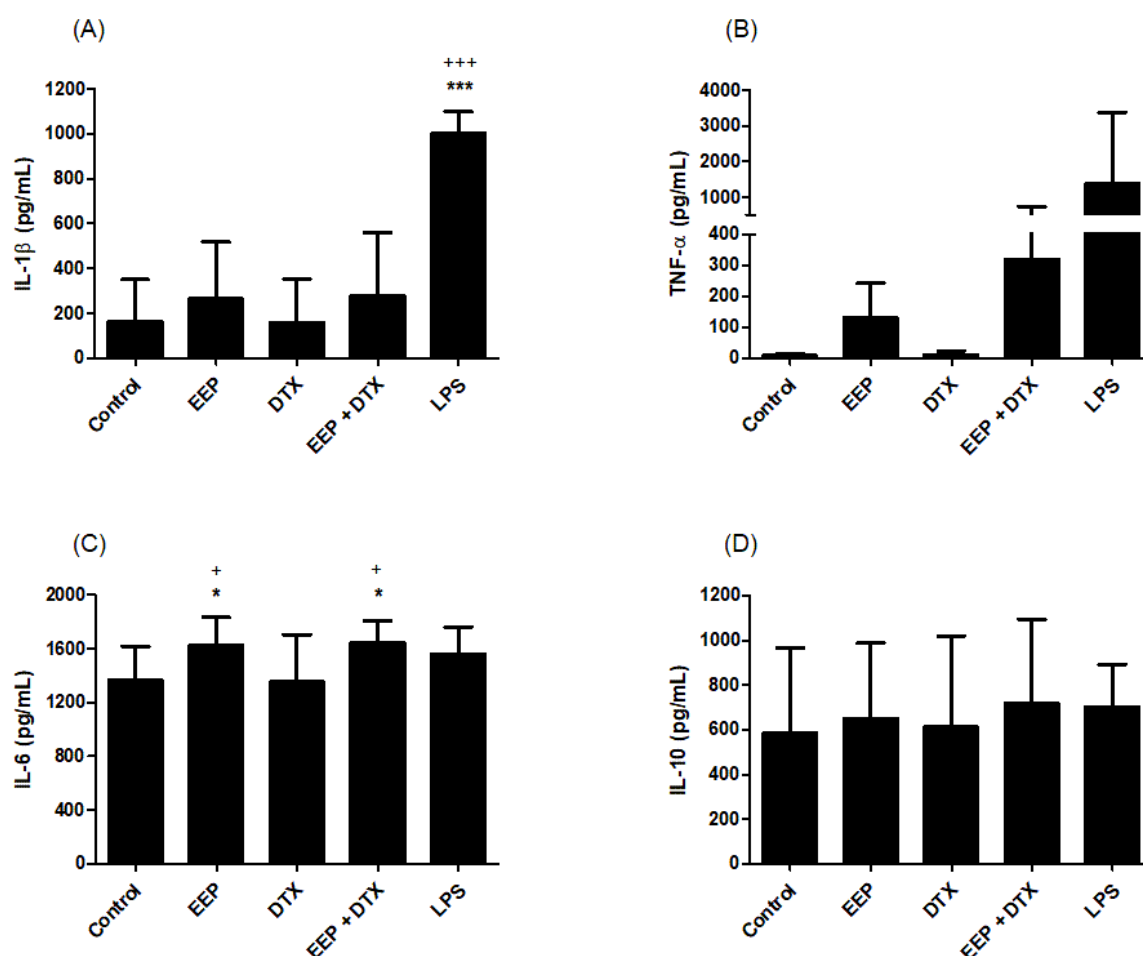


Figure 5. IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) production (pg/mL) by monocytes after treatment with propolis (EEP – 25 µg/mL), docetaxel (DTX – 10 nM), combination EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM), and LPS (5 µg/mL) for 24 h. Monocytes were obtained from female donors (n = 10). Data represent mean and standard deviation. Significantly different from control: * (P < 0.05); *** (P < 0.001). Significantly different from DTX: + (P < 0.05); +++ (P < 0.001).

EEP restored the candidacidal activity of monocytes inhibited by DTX

EEP and DTX reduced the candidacidal activity of monocytes. However, their combination restored it to baseline levels similar to control (Figure 6). It is worth noting that the results presented an elevated standard deviation, indicating a high variability of cells obtained from different female donors.

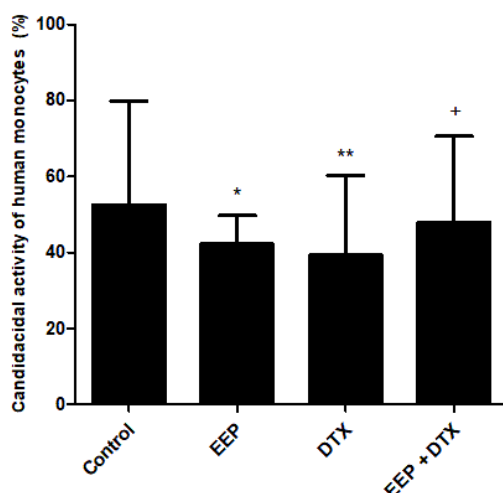


Figure 6. Percentage (%) of candidacidal activity of monocytes after treatment with propolis (EEP – 25 µg/mL), docetaxel (DTX – 10 nM) and EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM) for 24 h. Monocytes were obtained from female donors (n = 10). Data represent mean and standard deviation. Significantly different from control: * (P < 0.05); ** (P < 0.01). Significantly different from DTX: + (P < 0.05).

EEP and EEP+DTX reduced ROS generation by monocytes

DCFH-DA acts by crossing the cell membrane and is deacetylated by esterases, resulting in the compound DCFH that is oxidized by ROS producing a fluorescent form: DCF. The fluorescence emission determines the rate of ROS produced by monocytes.

In our assays, EEP and EEP+DTX reduced the median fluorescence intensity of DCF, indicating that the stimuli inhibited ROS generation by monocytes (Figure 7).

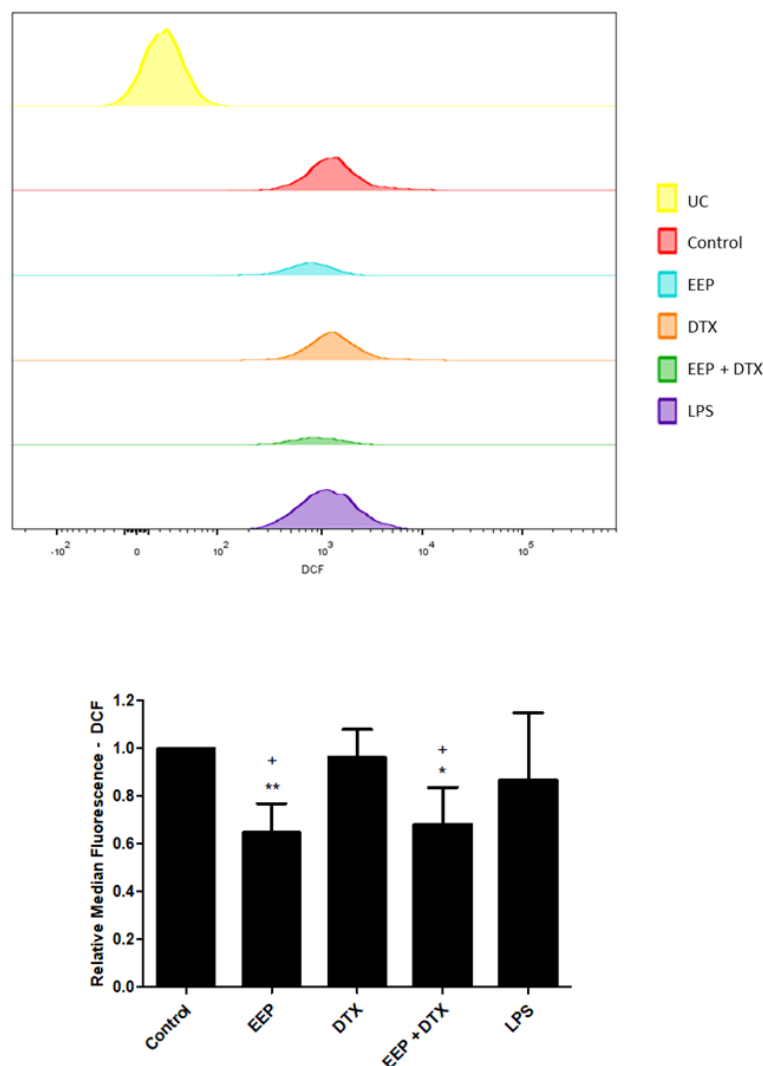


Figure 7. DCF relative median fluorescence intensity of monocytes after treatment with propolis (EEP – 25 $\mu\text{g/mL}$), docetaxel (DTX – 10 nM), EEP (25 $\mu\text{g/mL}$) + DTX (10 nM), and LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. UC corresponds to unstained control. Monocytes were obtained from female donors ($n = 10$). Data represent mean and standard deviation. Significantly different from control: * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$). Significantly different from DTX: + ($P < 0.05$).

Supernatants of monocytes treated with EEP+DTX had no effects on MCF-7 cell viability

The supernatants obtained from monocytes treated with the stimuli could contain several mediators able to affect the viability and growth of tumor cells. Here, EEP alone and in combination with DTX did not exert any effect on MCF-7 cell viability. Only the supernatants from cultures treated with DTX and LPS diminished the viability of tumor cells (Figure 8).

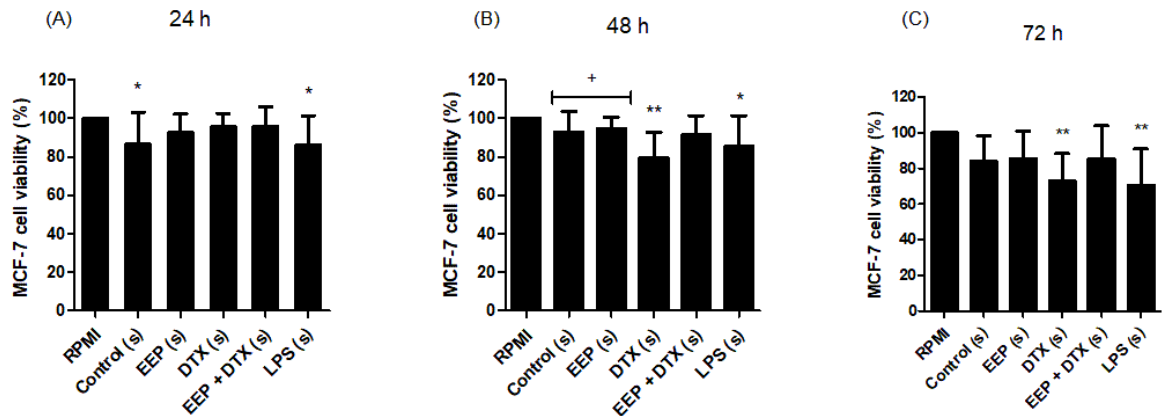


Figure 8. Viability (%) of MCF-7 cells after incubation with supernatants (s) obtained from monocytes incubated with EEP (25 μ g/mL), DTX (10 nM), EEP (25 μ g/mL) + DTX (10 nM), LPS (5 μ g/mL) and medium alone (control) for 24, 48 and 72 h. RPMI was used as control of viable MCF-7 cells. Assays were performed three times in triplicates. Monocytes were obtained from female donors (n = 10). Data represent mean and standard deviation. Significantly different from RPMI: * (P < 0.05); ** (P < 0.01). Significantly different from DTX: + (P < 0.05).

Effect of the supernatants from monocytes treated with EEP+DTX on the migratory and invasive capacity of MCF-7 cells

While EEP+DTX directly decreased MCF-7 cell migration, on the other hand, the supernatant from monocytes treated with EEP+DTX seemed to induce the migratory and invasive potential of breast tumor cells (Figure 9).

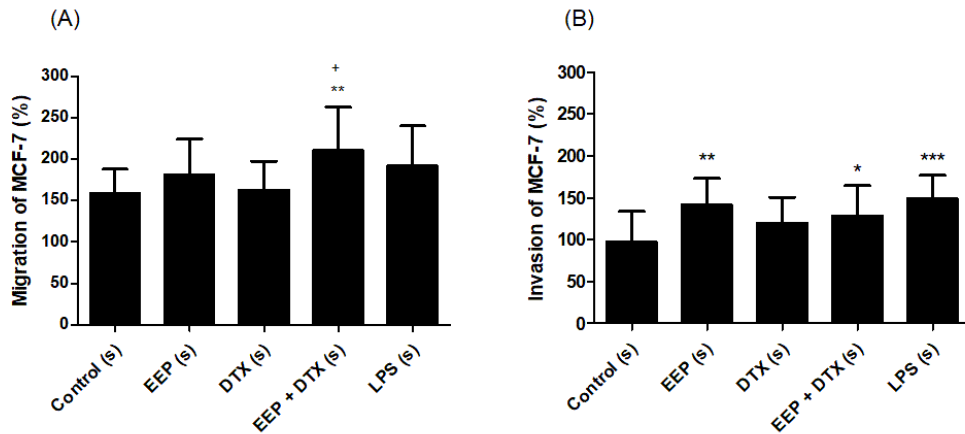


Figure 9. Percentage (%) of migration (A) and invasion (B) of MCF-7 cells treated with supernatants (s) from monocytes cultured DTX (10 nM), EEP (25 µg/mL), DTX (10 nM) + EEP (25 µg/mL), and LPS (5 µg/mL) for 24 h. Assays were performed three times in triplicate. Monocytes were obtained from female donors (n = 10). Data represent mean and standard deviation. Significantly different from Control: * (P < 0.05); ** (P < 0.01); *** (P < 0.001). Significantly different from DTX: + (P < 0.05).

Discussion

Docetaxel is a well-known chemotherapeutic drug employed against breast cancer (Montero et al., 2005). In our study, DTX exerted a cytotoxic action against MCF-7 cells, what is in agreement with Morse et al. (2005). Hernandez-Vargas et al. (2007) observed that DTX may act in this cell lineage according to its concentration: concentrations lower than 10 nM induced necrosis, while 100 nM induced cell cycle arrest on G2/M phase, leading to apoptosis. To verify the type of cell death after treatment with DTX, EEP or their combination, MCF-7 cells were incubated for 24 h with the stimuli and a low percentage of apoptosis or necrosis was observed in EEP- and DTX-treated cells. The combination EEP+DTX induced a more prominent necrosis than apoptosis.

Brazilian green propolis exhibits a cytotoxic activity against several cancer lineages (Sforcin, 2016). Here, EEP affected the viability of MCF-7 cells using concentrations higher than 50 µg/mL after 72 h (supplementary data). These cells were more resistant to propolis action than canine osteosarcoma and laryngeal epidermoid carcinoma HEP-2 cells (Cinegaglia et al., 2013; Silva et al., 2017). Lower concentrations (<20 µg/mL) of Brazilian green propolis did not affect MCF-7 cells (Kamiya et al., 2012). Propolis samples from different countries also showed a cytotoxic action against MCF-7 cells: Chinese propolis - 25-200 µg/mL after 24 and 48 h (Xuan et al., 2014); Indian propolis - 100 and 250 µg/mL after 24 h (Choudhari et al., 2013), and Turkish propolis at concentrations higher than 63 µg/mL after 24 h (Seda Vatansever et al., 2010). These findings demonstrated that MCF-7 cells are not easily destroyed by propolis samples; moreover, propolis from different geographic regions present distinct chemical compounds, which are responsible for their diverse pharmacological activity.

Mankind has used natural products for treating several diseases for centuries. More recently, some countries have adopted Complementary and Alternative Medicine including the use of natural products concomitantly with conventional medicine. This approach could be beneficial for cancer patients, favoring the pharmacokinetics of some drugs, preventing tumor cell resistance to chemotherapy and minimizing side effects (Tsai et al., 2017). Therefore, the interaction of natural products with reduced concentrations of chemotherapeutic drugs should

be investigated not only to avoid adverse effects but also to observe a possible antagonistic effect. Accordingly, our group has previously investigated the combination of bee products with different drugs. Geopropolis produced by stingless bees improved the effects of doxorubicin against HEP-2 cells (Bartolomeu et al., 2016). Propolis made by honeybees enhanced the cytotoxic effect of carboplatin against canine osteosarcoma cells (Bernardino et al., 2018). In our study, EEP improved DTX cytotoxic effects against MCF-7 cells.

Regarding the cytotoxic activity of EEP+DTX against MCF-7 cells, our data revealed that the best combination was EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM). This combination induced cell death by necrosis; moreover, EEP+DTX inhibited the migration of MCF-7 cells. This may be a probable effect of DTX in the dynamics of microtubules responsible for cell movement during migration (Teoh & Pavelka, 2016).

In continuity, we investigated the effects of EEP+DTX on women monocytes. These cells recognize and present antigens to T lymphocytes to activate adaptive immunity, and attack tumor cells due to phagocytosis and by producing cytokines and ROS. Many studies have demonstrated that DTX reduces the number of neutrophils and lymphocytes and increases eosinophils in cancer patients (Tong et al., 2000; Tsavaris et al., 2002; Hamdan et al., 2019). DTX caused lymphopenia in mice with prostate cancer, what was prevented by treating the animals with the mushroom extract of *Trametes versicolor* (Wenner et al., 2012). In our assays, neither DTX nor EEP exerted a cytotoxic action in monocytes. This is an interesting finding, revealing a differential effect of EEP+DTX on tumor (MCF-7) cells but not on immune (monocyte) cells.

Regarding monocyte functions, DTX did not affect the expression of TLR-2 and TLR-4, which are important for microbial antigen recognition. DTX did not affect HLA-DR expression, what is in accordance with previous work assessing dendritic cells (Nakashima et al., 2005) and macrophages (Millrud et al., 2018). This molecule is a fundamental key for antigen presentation by monocytes and its reduction is associated to an increased risk of nosocomial infections and a lower survival of patients undergoing chemotherapy (Kim et al., 2010; Hotchkiss et al., 2013; Higashi et al., 2015).

On the other hand, EEP and EEP+DTX upregulated HLA-DR expression by monocytes, indicating a positive effect of propolis favoring antigen presentation. However, EEP+DTX reduced CD80 expression, which is a co-stimulatory molecule required for T cell activation. The impaired interaction between CD80 and CD28 may lead lymphocytes to anergy or death, while the proper binding supports the activation of the Th1 profile, contributing to the antitumor immune response (Wolk et al., 2000; Mattern et al., 1998; Lahat et al., 2003). EEP enhanced

CD80 expression induced by *Escherichia coli* enterotoxin B in human monocytes (Conte et al., 2021), what suggested that the effects of EEP+DTX on CD80 expression was due to DTX. Additionally, this effect may also be due to the chemical composition of propolis, since another Brazilian sample – the red propolis – had an opposite effect on murine macrophages, inducing CD80 gene expression (Bueno-Silva et al., 2015).

As for cytokine production by monocytes, treatments did not seem to affect IL-1 β . Although EEP+DTX induced TNF- α production, this increase was not statistically significant. This fact is biologically important and deserves attention, since the combination was able to increase the levels of this pro-inflammatory cytokine, which may induce apoptosis and impair the proliferation of tumor cells *in vitro* (Esquivel-Velázquez et al., 2015). Importantly, it is worth mentioning that assays involving human individuals also present a high variability, making it difficult to understand the real meaning of some biological effects.

Regarding DTX effects, similar findings were reported by Elsea et al. (2008) and Mahon et al. (2015) assessing IL-1 β production by murine RAW 264.7 macrophages and U937 monocytes co-cultured with prostatic tumor cells. Our data is also in agreement with Manthey et al. (1993) and Burkhart et al. (1994) investigating TNF- α production by human monocytes and murine macrophages. On the other hand, Millrud et al. (2018) reported detectable levels of IL-1 β produced by macrophages treated with higher concentrations of DTX (1 and 10 μ M); moreover, Elsea et al. (2008) observed a higher TNF- α expression in RAW 264.7 cells using 5 μ M of DTX. Plasma TNF- α concentration was elevated in 30% of patients treated with DTX for 4 weeks (Tong et al., 2000). Thus, diverse concentrations, timetables and biological models may lead to different results regarding DTX influence on cytokine production.

DTX did not affect IL-6 production in our *in vitro* model. The treatment of women with breast cancer using DTX increased IL-6, GM-CSF and IFN- γ and reduced IL-1 β , TNF- α and PGE2 production by these patients, causing lymphopenia that is associated to elevated risk of opportunistic infections (Tsavaris et al., 2002). EEP+DTX induced a higher IL-6 production, which is involved in acute inflammation, whereas it may also be associated to neoplasm development. IL-6 induces breast tumor cell proliferation and drives estrogen-responsive cells to an aggressive phenotype. IL-6 and other pro-inflammatory cytokines are also associated to a higher cancer cell migration rate (Esquivel-Velázquez et al., 2015), possibly related to MCF-7 cell migration and invasiveness after incubation with the supernatant obtained from monocyte culture treated with EEP+DTX. Besides, tumor cells themselves can produce high IL-6 levels, promoting tumor growth, resistance to chemotherapy and metastasis (Mauer et al., 2015).

None of the stimuli affected IL-10 production in our study. Tong et al. (2000) observed no changes in IL-10 production by patients treated with DTX for 4 weeks. The anti-inflammatory cytokine IL-10 is involved in the impaired antitumoral response (Esquivel-Velazquez et al., 2015). In fact, Alter et al. (2010) observed that immunosuppressed patients exhibited elevated IL-10 concentrations, impairing the immune response against tumors.

Chemotherapy may cause immunosuppression that in turn leads to the emergence of opportunistic infections. *Candida albicans* infection is commonly observed in cancer patients. It may cause a superficial infection in healthy people but can be lethal for more than 30% of immunosuppressed individuals (Wisplinghoff et al., 2004; Netea et al., 2008; Teoh & Pavelka, 2016). As a tool to combat infectious microorganisms and tumor cells, phagocytosis is a well-described mechanism utilized by immune cells such as neutrophils, macrophages and monocytes (Feng et al., 2019). However, phagocytosis can be compromised due to DTX action in microtubules (Teoh & Pavelka, 2016). Therefore, we investigated the effect of EEP+DTX on the activity of monocytes against *C. albicans*. Both EEP and DTX diminished the candidacidal activity of monocytes whilst the combination EEP+DTX exerted an immunorestorative action. This is a positive result, since *C. albicans* escape mechanisms may contribute to breast tumor growth in mice by inducing IL-10 production by the host and reducing IFN- γ production, consequently inhibiting the Th1 response that is effective against infections and tumor development (Ahmadi et al., 2019).

Half of FDA-approved anticancer drugs such as cisplatin, doxorubicin and DTX are inducers of ROS generation in nontargeted tissues, which are toxic and critically involved in the oxidative stress (Chen et al., 2007; Tabaczar et al., 2012; Bas et al., 2019). Blocking ROS production by monocytes/macrophages inhibits their differentiation in tumor promoting cells, potentiating anticancer treatments (Zhang et al., 2013). ROS may exert a dual role in the antitumoral immunity: they may be one of the mechanisms involved in the lysis of tumor cells. In contrast, ROS may induce monocytes/macrophages differentiation in M2-macrophages, which produce breast tumor mitogenic and angiogenic factors. Hereby, EEP alone or in combination with DTX inhibited ROS generation, demonstrating not only the antioxidant activity of propolis but also suggesting the antitumoral profile of monocytes.

In an attempt to assess the effects of the mediators produced by monocytes after incubation with the stimuli, the supernatants of monocyte cultures were taken and further incubated with MCF-7 cells. Data revealed that the molecules produced by monocytes did not affect the viability of tumor cells, probably because the stimuli did not induce enough concentration of tumoricidal substances to kill MCF-7 cells. However, one may observe that

the supernatant of DTX-treated monocytes showed similar effects to that presented by DTX directly on MCF-7 cells. This may probably be due to DTX residual concentration in the supernatant of the monocyte culture.

Summing up, our data demonstrated that EEP in combination with reduced concentrations of DTX displayed a cytotoxic activity against MCF-7 cells *in vitro*, inducing necrosis and impairing the migratory behavior. Moreover, EEP+DTX induced HLA-DR expression in human monocytes, favoring antigen presentation. EEP+DTX also induced higher levels of TNF- α and IL-6 production by activated monocytes, exerted an immunorestorative effect on the candidacidal activity and reduced the oxidative stress in these cells. These findings are new and relevant, demonstrating the effects of EEP+DTX against breast cancer cells and its impact on women monocytes. Preclinical assays should be carried out to check the effects of EEP+DTX in animals and further in clinical trials – a new approach aiming to improve the treatment of oncologic patients, avoiding the side effects of chemotherapy and exerting an immunomodulatory action.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP 2016/09986-4 and 2017/04138-8) for the grant, and Prof. Christiaan Moora for the English review.

Conflict of Interest

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

References

- Ahmadi, N., Ahmadi, A., Kheirali, E., Hossein Yadegari, M., Bayat, M., Shajiei, A., Amini, A. A., Ashrafi, S., Abolhassani, M., Faezi, S., Yazdanparast, S. A., & Mahdavi, M. (2019). Systemic infection with *Candida albicans* in breast tumor bearing mice: Cytokines dysregulation and induction of regulatory T cells. *Journal de mycologie medicale*, 29(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.10.006>
- Alonso-González, C., Menéndez-Menéndez, J., González-González, A., González, A., Cos, S., & Martínez-Campa, C. (2018). Melatonin enhances the apoptotic effects and modulates the changes in gene expression induced by docetaxel in MCF-7 human breast cancer cells. *International journal of oncology*, 52(2), 560–570. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4213>

- Alter, G., Kavanagh, D., Rihn, S., Luteijn, R., Brooks, D., Oldstone, M., van Lunzen, J., & Altfeld, M. (2010). IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), 1905–1913. <https://doi.org/10.1172/JCI40913>
- Bartolomeu, A. R., Frión-Herrera, Y., da Silva, L. M., Romagnoli, G. G., de Oliveira, D. E., & Sforcin, J. M. (2016). Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 81, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.049>
- Baş, E., & Nazıroğlu, M. (2019). Selenium attenuates docetaxel-induced apoptosis and mitochondrial oxidative stress in kidney cells. *Anti-cancer drugs*, 30(4), 339–346. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000723>
- Bernardino, P. N., Bersano, P., Lima Neto, J. F., & Sforcin, J. M. (2018). Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 104, 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.027>
- Bueno-Silva, B., Kawamoto, D., Ando-Suguimoto, E. S., Alencar, S. M., Rosalen, P. L., & Mayer, M. P. (2015). Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. *PloS one*, 10(12), e0144954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144954>
- Búfalo, M. C., Bordon-Graciani, A. P., Conti, B. J., de Assis Golim, M., & Sforcin, J. M. (2014). The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 66(10), 1497–1504. <https://doi.org/10.1111/jphp.12279>
- Burkhart, C. A., Berman, J. W., Swindell, C. S., & Horwitz, S. B. (1994). Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor- α gene expression and cytotoxicity. *Cancer research*, 54(22), 5779–5782.
- Cardoso, E. O., Conti, B. J., Santiago, K. B., Conte, F. L., Oliveira, L. P., Hernandez, R. T., Golim, M. A., & Sforcin, J. M. (2017). Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 69(1), 99–108. <https://doi.org/10.1111/jphp.12660>
- Carlson, L. J., Cote, B., Alani, A. W., & Rao, D. A. (2014). Polymeric micellar co-delivery of resveratrol and curcumin to mitigate in vitro doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(8), 2315–2322. <https://doi.org/10.1002/jps.24042>
- Chen, Y., Jungsuwadee, P., Vore, M., Butterfield, D. A., & St Clair, D. K. (2007). Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Molecular interventions*, 7(3), 147–156. <https://doi.org/10.1124/mi.7.3.6>
- Choudhari, M. K., Haghniaz, R., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2013). Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an in vitro study. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013, 928280. <https://doi.org/10.1155/2013/928280>
- Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R., Búfalo, M. C., & Sforcin, J. M. (2013). Cytotoxic action of Brazilian propolis in vitro on canine osteosarcoma cells. *Phytotherapy research: PTR*, 27(9), 1277–1281. <https://doi.org/10.1002/ptr.4861>

- Conte, F. L., Santiago, K. B., Conti, B. J., Cardoso, E. D. O., Oliveira, L. P. G., Feltran, G. D. S., Zambuzzi, W. F., Golim, M. A., Cruz, M. T., & Sforcin, J. M. (2020). Propolis from southeastern Brazil produced by *Apis mellifera* affects innate immunity by modulating cell marker expression, cytokine production and intracellular pathways in human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73, 135–144. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgaa023>
- Conti, B. J., Búfalo, M. C., Golim, M., Bankova, V., & Sforcin, J. M. (2013). Cinnamic Acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013, 109864. <https://doi.org/10.1155/2013/109864>
- Conti, B. J., Santiago, K. B., Cardoso, E. O., Freire, P. P., Carvalho, R. F., Golim, M. A., & Sforcin, J. M. (2016). Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF-κB activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 68(12), 1604–1612. <https://doi.org/10.1111/jphp.12628>
- da Silva, L. M., Frión-Herrera, Y., Bartolomeu, A. R., Gorgulho, C. M., & Sforcin, J. M. (2017). Mechanisms involved in the cytotoxic action of Brazilian propolis and caffeic acid against HEP-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 69(11), 1625–1633. <https://doi.org/10.1111/jphp.12789>
- de Oliveira Júnior, R. G., Christiane Adrielly, A. F., da Silva Almeida, J., Grougnet, R., Thiéry, V., & Picot, L. (2018). Sensitization of tumor cells to chemotherapy by natural products: A systematic review of preclinical data and molecular mechanisms. *Fitoterapia*, 129, 383–400. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.025>
- Elsa, C. R., Roberts, D. A., Druker, B. J., & Wood, L. J. (2008). Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PloS one*, 3(6), e2355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002355>
- Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., Palacios-Arreola, M. I., Nava-Castro, K. E., Castro, J. I., & Morales-Montor, J. (2015). The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 35(1), 1–16. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0026>
- Feng, M., Jiang, W., Kim, B., Zhang, C. C., Fu, Y. X., & Weissman, I. L. (2019). Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 19(10), 568–586. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0183-z>
- Frión-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., & Sforcin, J. M. (2015). Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 67(10), 1448–1456. <https://doi.org/10.1111/jphp.12449>
- Hagerling, C., Gonzalez, H., Salari, K., Wang, C. Y., Lin, C., Robles, I., van Gogh, M., Dejmeek, A., Jirström, K., & Werb, Z. (2019). Immune effector monocyte-neutrophil cooperation induced by the primary tumor prevents metastatic progression of breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(43), 21704–21714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907660116>

- Hamdan, D., Leboeuf, C., Le Foll, C., Bousquet, G., & Janin, A. (2019). Re-exploring immune-related side effects of docetaxel in an observational study: Blood hypereosinophilia. *Cancer medicine*, 8(5), 2005–2012. <https://doi.org/10.1002/cam4.2062>
- Hernández-Vargas, H., Palacios, J., & Moreno-Bueno, G. (2007). Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene*, 26(20), 2902–2913. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210102>
- Higashi, M., Tokuhira, M., Fujino, S., Yamashita, T., Abe, K., Arai, E., Kizaki, M., & Tamaru, J. (2016). Loss of HLA-DR expression is related to tumor microenvironment and predicts adverse outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 57(1), 161–166. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1038708>
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 13(12), 862–874. <https://doi.org/10.1038/nri3552>
- Hung, C. H., Chen, F. M., Lin, Y. C., Tsai, M. L., Wang, S. L., Chen, Y. C., Chen, Y. T., & Hou, M. F. (2018). Altered monocyte differentiation and macrophage polarization patterns in patients with breast cancer. *BMC cancer*, 18(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4284-y>
- Kamiya, T., Nishihara, H., Hara, H., & Adachi, T. (2012). Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 11065–11070. <https://doi.org/10.1021/jf303004n>
- Kim, O. Y., Monsel, A., Bertrand, M., Coriat, P., Cavaillon, J. M., & Adib-Conquy, M. (2010). Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. *Critical care (London, England)*, 14(2), R61. <https://doi.org/10.1186/cc8959>
- Lahat, N., Rahat, M. A., Ballan, M., Weiss-Cerem, L., Engelmayer, M., & Bitterman, H. (2003). Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF- α secretion. *Journal of leukocyte biology*, 74(2), 197–205. <https://doi.org/10.1189/jlb.0303105>
- Mahon, K. L., Lin, H. M., Castillo, L., Lee, B. Y., Lee-Ng, M., Chatfield, M. D., Chiam, K., Breit, S. N., Brown, D. A., Molloy, M. P., Marx, G. M., Pavlakis, N., Boyer, M. J., Stockler, M. R., Daly, R. J., Henshall, S. M., & Horvath, L. G. (2015). Cytokine profiling of docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer. *British journal of cancer*, 112(8), 1340–1348. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.74>
- Manthey, C. L., Qureshi, N., Stütz, P. L., & Vogel, S. N. (1993). Lipopolysaccharide antagonists block taxol-induced signaling in murine macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 178(2), 695–702. <https://doi.org/10.1084/jem.178.2.695>
- Mattern, T., Flad, H. D., Brade, L., Rietschel, E. T., & Ulmer, A. J. (1998). Stimulation of human T lymphocytes by LPS is MHC unrestricted, but strongly dependent on B7 interactions. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(7), 3412–3418.
- Mauer, J., Denson, J. L., & Brüning, J. C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in immunology*, 36(2), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.008>

- 668 Millrud, C. R., Mehmeti, M., & Leandersson, K. (2018). Docetaxel promotes the generation of
 669 anti-tumorigenic human macrophages. *Experimental cell research*, 362(2), 525–531.
 670 <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.12.018>
- 671 Mohme, M., Riethdorf, S., & Pantel, K. (2017). Circulating and disseminated tumour cells -
 672 mechanisms of immune surveillance and escape. *Nature reviews. Clinical oncology*, 14(3),
 673 155–167. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.144>
- 674 Montero, A., Fossella, F., Hortobagyi, G., & Valero, V. (2005). Docetaxel for treatment of solid
 675 tumours: a systematic review of clinical data. *The Lancet. Oncology*, 6(4), 229–239.
 676 [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70094-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70094-2)
- 677 Morse, D. L., Gray, H., Payne, C. M., & Gillies, R. J. (2005). Docetaxel induces cell death
 678 through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular cancer*
 679 *therapeutics*, 4(10), 1495–1504. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0130>
- 680 Nakashima, H., Tasaki, A., Kubo, M., Kuroki, H., Matsumoto, K., Tanaka, M., Nakamura, M.,
 681 Morisaki, T., & Katano, M. (2005). Effects of docetaxel on antigen presentation-related
 682 functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer chemotherapy and*
 683 *pharmacology*, 55(5), 479–487. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0918-7>
- 684 Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. (2008). An integrated model of the
 685 recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature reviews.*
 686 *Microbiology*, 6(1), 67–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1815>
- 687 Padmavathi, R., Senthilnathan, P., Chodon, D., & Sakthisekaran, D. (2006). Therapeutic effect
 688 of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl
 689 benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Life*
 690 *sciences*, 78(24), 2820–2825. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.005>
- 691 Sánchez, B. G., Bort, A., Mateos-Gómez, P. A., Rodríguez-Henche, N., & Díaz-Laviada, I.
 692 (2019). Combination of the natural product capsaicin and docetaxel synergistically kills
 693 human prostate cancer cells through the metabolic regulator AMP-activated kinase. *Cancer*
 694 *cell international*, 19, 54. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0769-2>
- 695 Santiago, K. B., Conti, B. J., Cardoso, E. O., Golim, M. A., & Sforcin, J. M. (2016).
 696 Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on
 697 human monocytes. *Pathogens and disease*, 74(8), ftw081.
 698 <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw081>
- 699 Seda Vatansever, H., Sorkun, K., Ismet Deliloğlu Gurhan, S., Ozdal-Kurt, F., Turkoz, E.,
 700 Gencay, O., & Salih, B. (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating
 701 caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta histochemica*, 112(6), 546–556.
 702 <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.06.001>
- 703 Sforcin J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of
 704 Propolis. *Phytotherapy research: PTR*, 30(6), 894–905. <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>
- 705 Sim, S., Bergh, J., Hellström, M., Hatschek, T., & Xie, H. (2018). Pharmacogenetic impact of
 706 docetaxel on neoadjuvant treatment of breast cancer patients. *Pharmacogenomics*, 19(16),
 707 1259–1268. <https://doi.org/10.2217/pgs-2018-0080>
- 708 Singh, S. K., Banerjee, S., Acosta, E. P., Lillard, J. W., & Singh, R. (2017). Resveratrol induces
 709 cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/

- 710 p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget*, 8(10), 17216–17228.
 711 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15303>
- 712 Tabaczar, S., Koceva-Chyla, A., Czepas, J., Pieniazek, A., Piasecka-Zelga, J., & Gwozdziński,
 713 K. (2012). Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel
 714 in blood plasma of rats bearing mammary tumor. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 63(2), 153–163.
- 716 Teoh, F., & Pavelka, N. (2016). How Chemotherapy Increases the Risk of Systemic Candidiasis
 717 in Cancer Patients: Current Paradigm and Future Directions. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens5010006>
- 719 Tong, A. W., Seamour, B., Lawson, J. M., Ordonez, G., Vukelja, S., Hyman, W., Richards, D.,
 720 Stein, L., Maples, P. B., & Nemunaitis, J. (2000). Cellular immune profile of patients with
 721 advanced cancer before and after taxane treatment. *American journal of clinical*
 722 *oncology*, 23(5), 463–472. <https://doi.org/10.1097/00000421-200010000-00007>
- 723 Tsai, C. H., Tzeng, S. F., Hsieh, S. C., Yang, Y. C., Hsiao, Y. W., Tsai, M. H., & Hsiao, P. W.
 724 (2017). A standardized herbal extract mitigates tumor inflammation and augments
 725 chemotherapy effect of docetaxel in prostate cancer. *Scientific reports*, 7(1), 15624.
 726 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15934-0>
- 727 Tsavaris, N., Kosmas, C., Vadiaka, M., Kanelopoulos, P., & Boulamatsis, D. (2002). Immune
 728 changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with
 729 taxanes. *British journal of cancer*, 87(1), 21–27. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600347>
- 730 Wang, P., Henning, S. M., Heber, D., & Vadgama, J. V. (2015). Sensitization to docetaxel in
 731 prostate cancer cells by green tea and quercetin. *The Journal of nutritional*
 732 *biochemistry*, 26(4), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.11.017>
- 733 Wenner, C. A., Martzen, M. R., Lu, H., Verneris, M. R., Wang, H., & Slaton, J. W. (2012).
 734 Polysaccharide-K augments docetaxel-induced tumor suppression and antitumor immune
 735 response in an immunocompetent murine model of human prostate cancer. *International*
 736 *journal of oncology*, 40(4), 905–913. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1292>
- 737 Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B.
 738 (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a
 739 prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases: an official*
 740 *publication of the Infectious Diseases Society of America*, 39(3), 309–317.
 741 <https://doi.org/10.1086/421946>
- 742 Wolk, K., Döcke, W. D., von Baehr, V., Volk, H. D., & Sabat, R. (2000). Impaired antigen
 743 presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*, 96(1), 218–223.
- 744 Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., Wang, Y., & Hu, F. (2014). Antitumor
 745 Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231
 746 Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2014, 280120.
 747 <https://doi.org/10.1155/2014/280120>
- 748 Zhang, Y., Choksi, S., Chen, K., Pobezinskaya, Y., Linnoila, I., & Liu, Z. G. (2013). ROS play
 749 a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence
 750 of tumor-associated macrophages. *Cell research*, 23(7), 898–914.
 751 <https://doi.org/10.1038/cr.2013.75>
- 752

753

Supplementary Material

Treatments	24 h	48 h	72 h
Control	100	100	100
DTX 1	95.64 ± 6.226	90.32 ± 9.926 **	98.01 ± 5.426
DTX 2.5	90.03 ± 8.804 ***	85.34 ± 7.872 ***	90.03 ± 12.47 **
DTX 5	88.46 ± 7.770 ***	76.91 ± 9.614 ***	85.60 ± 9.403 ***
DTX 10	89.65 ± 8.049 ***	73.69 ± 8.385 ***	83.47 ± 10.19 ***
DTX 25	84.05 ± 7.867 ***	66.79 ± 8.905 ***	77.04 ± 10.39 ***
DTX 50	83.45 ± 8.376 ***	65.26 ± 6.570 ***	57.37 ± 7.732 ***
DTX 75	81.87 ± 10.05 ***	63.38 ± 6.126 ***	59.52 ± 8.291 ***
DTX 100	78.98 ± 6.223 ***	56.30 ± 7.422 ***	56.40 ± 7.918 ***

Table 1. Viability (%) of MCF-7 cells treated with docetaxel (DTX - 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 and 100 nM) for 24, 48 and 72 h. Assays were performed three times in triplicate. Data represent mean ± standard deviation. Significantly different from control (only DMEM medium): ** (P < 0.01); *** (P < 0.001).

Treatments	24 h	48 h	72 h
Control	100	100	100
EEP25	100	98.66 ± 1.599	90.01 ± 8.858
EEP50	100	93.90 ± 10.57	86.06 ± 8.302 *
EEP75	100	94.45 ± 2.323	84.94 ± 5.734 *
EEP100	100	99.25 ± 1.300	83.08 ± 2.513 *

Table 2. Viability (%) of MCF-7 cells treated with propolis (EEP - 25, 50, 75 and 100 µg/mL) for 24, 48 and 72 h. Assays were performed three times in triplicate. Data represent mean ± standard deviation. Significantly different from control (only DMEM medium): ** (P < 0.01); *** (P < 0.001). Significantly different from DTX: + (P < 0.05); ++ (P < 0.01).

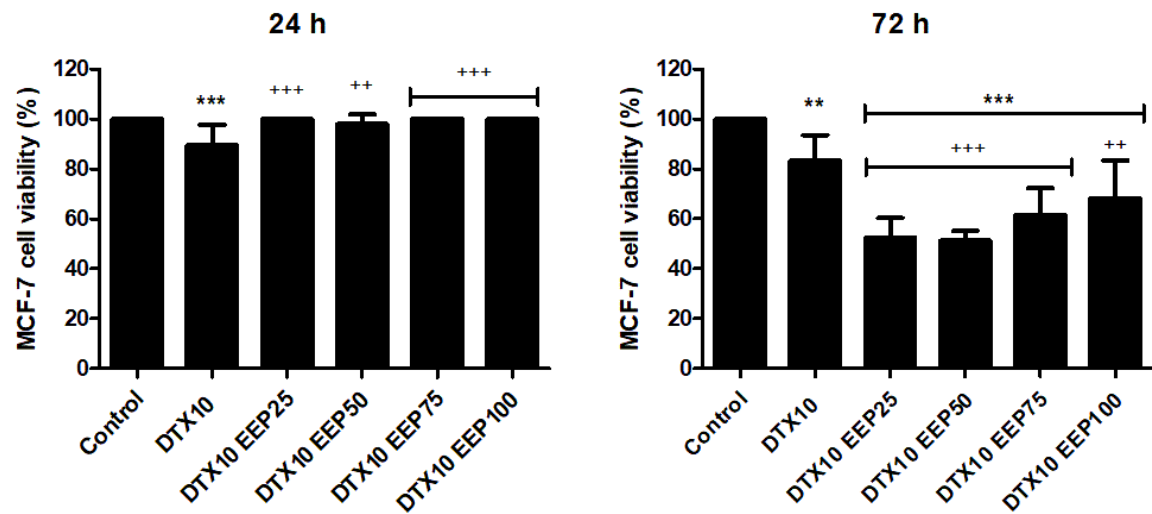


Figure S1. Viability (%) of MCF-7 cells treated with the combination docetaxel (DTX - 10 nM) and propolis (EEP - 25 – 100 µg/mL) for 24 and 72h. Assays were performed three times in triplicate. Data represent mean and standard deviation. Significantly different from control: ** (P < 0.01); *** (P < 0.001). Significantly different from DTX: ++ (P < 0.01); +++ (P < 0.001).

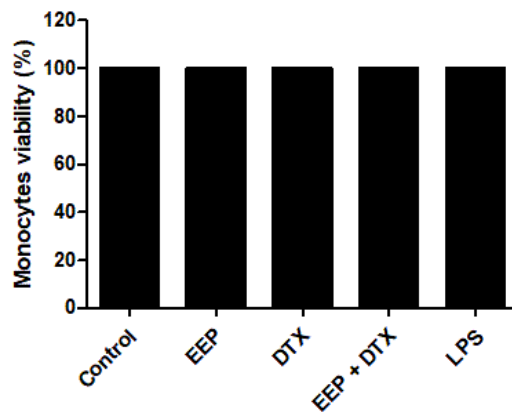


Figure S2. Viability (%) of monocytes treated with EEP (25 µg/mL), DTX (10 nM), EEP (25 µg/mL) + DTX (10 nM), and LPS (5 µg/mL) for 48 h. Monocytes were obtained from female donors (n = 5). Data represent mean and standard deviation (P > 0.05).

Conclusão

Conclusão

Nossos dados demonstraram que a própolis (EEP) combinada às concentrações reduzidas de docetaxel (DTX) apresentou atividade citotóxica contra a linhagem MCF-7 de câncer de mama *in vitro*, induzindo necrose e inibindo sua migração. A combinação EEP+DTX induziu maior expressão de HLA-DR em monócitos humanos, favorecendo a apresentação de antígenos. EEP+DTX também induziu aumento na produção de TNF- α e IL-6 por monócitos, restaurou a atividade candidacida e reduziu o estresse oxidativo destas células. Tais achados são relevantes e demonstram os efeitos da combinação EEP+DTX contra células de cânceres de mama e seu impacto em monócitos obtidos de mulheres saudáveis. Posteriores ensaios pré-clínicos e clínicos poderão ser realizados para observar os efeitos dessa combinação, podendo ser uma nova abordagem que objetiva melhorar o tratamento de pacientes oncológicos, reduzindo os efeitos colaterais da quimioterapia e exercendo ação imunomoduladora.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012 – DOADOR SAUDÁVEL

CONVIDO, o(a) Senhor(a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado "Ação da própolis associada ao docetaxel sobre células de câncer de mama e sobre monócitos humanos", que será desenvolvido por mim, MSc. Eliza de Oliveira Cardoso, sob orientação do Professor José Maurício Sforcin, do Instituto de Biociências (UNESP - Botucatu).

Estou estudando os efeitos da própolis associada a um produto quimioterápico (docetaxel) sobre determinadas células do sistema imunológico (monócitos). Para que eu possa obter estas células, preciso coletar 20 mL do seu sangue. Sua participação nesta pesquisa se dará por ser uma pessoa saudável, sem nenhum tipo de doença. O(a) senhor(a) não será tratado com a própolis ou com o produto quimioterápico, apenas as suas células. Os riscos para o(a) senhor(a) será em relação a picada da agulha para a coleta de sangue, que poderá ser dolorida e no local poderá aparecer uma mancha roxa e ficar sensível.

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. O(a) senhor(a) não terá benefício direto em participar desta pesquisa, porém com sua doação permitirá a realização desta pesquisa, a qual poderá beneficiar futuros pacientes com câncer de mama que realizam quimioterapia.

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

Participante da Pesquisa

Pesquisadora: MSc. Eliza de Oliveira Cardoso
Depto. de Microbiologia e Imunologia
IB - UNESP - Campus Botucatu
(14) 3880 0425
elizaolivecardoso@gmail.com

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