

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA (PVB) EM LINHAGEM CELULAR DE MACRÓFAGOS

JULIETI HUCH BUSS<sup>1</sup>; LIZIANE PEREIRA DA SILVA<sup>2</sup>; KARINE RECH BEGNINI<sup>2</sup>;  
NATÁLIA VIEIRA SEGATTO<sup>1</sup>; JOÃO ANTÔNIO PEGAS HENRIQUES<sup>3</sup>; FABIANA  
KOMMLING SEIXAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Graduação em Biotecnologia,  
Centro de desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas -  
[julietibuss@hotmail.com](mailto:julietibuss@hotmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGB), Centro de desenvolvimento Tecnológico,  
Universidade Federal de Pelotas – [seixas.fk@gmail.com](mailto:seixas.fk@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil.

### 1. INTRODUÇÃO

A resposta imunológica é um processo fisiológico extremamente importante em diversas patologias, dentre elas o câncer. Os macrófagos são células fagocíticas chave em respostas imunes inatas e respostas pró-inflamatórias, e desempenham papel de extrema importância em processos de combate a carcinogênese (GARCIA et al., 2007).

Os macrófagos exercem várias funções fundamentais na resposta imune do hospedeiro, além de apresentarem função como células apresentadoras de抗ígenos, também podem atuar como células citotóxicas efetoras em combate a tumores, como por exemplo, contra tumores de bexiga (LUO et al., 2010) onde servem como primeira linha de defesa do organismo contra a neoplasia (ZHAO et al., 2000).

Dentre as atividades antitumorais exercidas por essas células, estão a liberação de moléculas efetoras, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO), moléculas conhecidas por induzir a apoptose celular, e a liberação de outras citocinas que modulam resposta inflamatória (LUO et al., 2003).

Considerando o potencial antitumoral dos macrófagos, exercido pela sua atividade citotóxica, vários estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias capazes de auxiliar o sistema imune nesse processo (FISCHER et al., 2008).

Produtos naturais, como a própolis, tem recebido grande atenção por ser considerado uma fonte com potencial imunomodulatório em diversas patologias (FISCHER et al., 2008; SAWICKA et al., 2012).

A própolis consiste em uma mistura resinosa de substâncias coletadas pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de diversas plantas, sendo o Brasil detentor da maior variedade de tipos deste composto (RIGHI et al., 2013). A Própolis Vermelha Brasileira (PVB) é o tipo mais recentemente identificado e, desde sua descoberta, tem sido amplamente estudada devido a suas propriedades antitumorais contra uma ampla variedade de tipos de câncer (DORNELAS et al., 2012; FROZZA et al., 2013; BEGNINI et al., 2014).

Alguns de seus mecanismos de ação já elucidados incluem: supressão da proliferação de células tumorais via efeitos imunomodulatórios; bloqueio de vias de sinalização específicas de oncogenes; modulação do microambiente tumoral; além de agir como tratamento adjunto ou complementar a terapias anticâncer tradicionais (CHAN et al., 2013).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira (PVB) na imunomodulação de linhagem celular de macrófagos murinos (J774A.1) cultivados *in vitro*.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Preparação do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha

As amostras de própolis vermelha foram coletadas no nordeste brasileiro ( $21^{\circ}28'25''W$  e  $36^{\circ}26'12''S$ ) em setembro de 2011. O extrato foi preparado segundo metologia empregada por Frozza et al. (2013) e o extrato seco foi mantido congelado a  $-20^{\circ}C$ . As concentrações finais do extrato (12,5; 25; 50 e 100 $\mu$ g/mL) foram preparadas imediatamente antes do uso utilizando EtOH-H<sub>2</sub>O 50% (v/v).

### 2.2. Cultivo Celular

A linhagem celular de macrófagos murinos J774A.1 foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para a realização dos ensaios, as células foram cultivadas em monocamada, em placas de 6 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço utilizando meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% Lglutamina e 1% penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas em estufa a temperatura de  $37^{\circ}C$ , 95% umidade e 5%CO<sub>2</sub>. Após atingirem grau desejável de confluência, as células foram submetidas a diferentes concentrações de extrato etanólico da própolis vermelha (12,5; 25; 50 e 100 $\mu$ g/mL) durante o período de 24 horas.

### 2.3. Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em Tempo Real

Para a análise da expressão dos genes IL-4 e IL-12, o RNA total foi extraído a partir de TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, USA) e purificado com clorofórmio e isopropanol. Após a quantificação, o cDNA foi sintetizado a partir de 3 $\mu$ g de RNA com uso de *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit*. Posteriormente esse cDNA foi amplificado por PCR em tempo real utilizando *primers* específicos para os genes IL-4 e IL-12. O gráfico de expressão relativa foi gerado pelo método  $2\Delta\Delta^{C_t}$  (LIVAK et al., 2001).

### 2.4. Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados através de one-way ANOVA, seguido por teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes nas análises. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos naturais são considerados uma fonte ilimitada para a descoberta de drogas antitumorais (PAN et al., 2010). O uso desses produtos tem sido bastante visado, sendo a própolis e seus compostos, uma alternativa promissora devido a seu potencial imunomodulatório contra tumores. (CHAN et al., 2013; SAWICKA et al., 2012).

A IL-12 desempenha um papel fundamental na ativação da imunidade antitumoral (KOVACS, 2001), através de sua capacidade de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , e ativar células citotóxicas (NEURATH, 2015). Por outro lado, a IL-4 medeia funções inibitórias de interleucinas inflamatórias, desempenhando papel auxiliar no desenvolvimento de neoplasias (SUZUKI et al., 2015).

O presente estudo avaliou a capacidade da PVB na imunomodulação de macrófagos, avaliando a expressão das interleucinas IL-4 e IL-12. Os resultados demonstraram uma tendência biológica no aumento da expressão de IL-12 conforme o aumento da concentração de PVB. Segundo Fisher et al. (2008) a própolis também foi capaz de induzir a expressão da citocina IFN- $\gamma$ , porém mais citocinas pró-inflamatórias deverão ser analisadas, como por exemplo a IL-18, descrita anteriormente por apresentar atividade sinérgica a IL-12, induzindo IFN- $\gamma$  e IL-12 (ETO, 2005) a fim de melhor compreensão do efeito imunomodulador do composto.

Apesar de demonstradas algumas atividades imunomoduladoras da própolis como ativação de macrófagos e aumento das respostas imunes humoral e celular (FISCHER et al., 2007), a imunomodulação exercida ocorre de forma contraditória, às vezes sendo descrita como estimulante, e outras vezes como inibidora de determinados eventos imunológicos, devido a variabilidade da composição do produto, assim como da forma de extração de composto bioativos (FISCHER et al., 2008).

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que neste estudo os tratamentos com PVB demonstraram uma tendência no aumento da expressão de IL-12, importante citocina na imunidade antitumoral. Além disso, podemos inferir que mais pesquisas são necessárias visando a caracterização da PVB, devido à diversidade química de sua composição, assim como avaliação de outras importantes citocinas envolvidas na imunidade tumoral.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEGNINI, K.R.; MOURA DE LEON, P.M.; THUROW, H.; SCHULTZE, E.; CAMPOS, V.F.; MARTINS RODRIGUES, F.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; SAVEGNAGO, L.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; COLLARES, T.; PÊGAS HENRIQUES, J.A.; SEIXAS, F.K. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, p.1-13, 2014.

CHAN, G.C.; CHEUNG, K.W.; SZE, D.M. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clin Rev Allergy Immunol**, v.44, p.262-273, 2013.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, L.D.; HÜBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, p.1250- 1256, 2007.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, L.D.; HÜBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T.

Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v.25, p.1250-1256, 2007.

FISCHER, G.; HÜBNER, S.G.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol.**, v.75, n.2, p.247-253, 2008.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, L.D.; HÜBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v.25, p.1250-1256, 2007.

FROZZA, CO.; GARCIA, C.S.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M.D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.52, p.137-142, 2013.

GARCIA, M.; JEMAL, A.; WARD, E.M.; CENTER, M.M.; HAO, Y.; SIEGEL, R.L.; THUN, M.J. Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA, American Cancer Society, 2007.

KOVACS, E. The serum levels of IL-12 and IL-16 in cancer patients. Relation to the tumour stage and previous therapy. **Biomed Pharmacother**, v.55, p.111- 116, 2001.

LUO, Y.; CHEN, X.; O'DONNELL, M.A. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. **Cytokine**, v.21, p.17–26, 2003.

LUO, Y.; HAN, R.; EVANOFF, D.P.; CHEN, X. Interleukin-10 inhibits *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v.160, p.359–368, 2010.

NEURATH, S.Z.M.F. Interleukin-12: functional activities and implications for disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, p.1-33, 2015.

PAN, L.; CHAI, H; KINGHOM, AD. The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochem Lett**, v.3, p.1-8, 2010.

RIGHI, AA; NEGRI, G; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2013.

SAWICKA, D; CAR, H; BORAWSKA, MH; NIKLINSKI, J. The anticancer activity of propolis. **Folia Histochem Cytobiol**, v.50, p.25-37, 2012.

SUZUKI, A.; LELAND, P.; JOSHI, B.H.; PURI, R.K. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine**, p.1-10, 2015.

ZHAO W, SCHOREY JS, BONG-MASTEK M, RITCHIEY J, BROWN EJ, RATLIFF TL. Role of a bacillus Calmette–Guérin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. **Int J Cancer**, v.86, p.83–8, 2000.