



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO
EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS G6 BAIANA**

NANASHARA COELHO DE CARVALHO

**Salvador - Bahia - Brasil
2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PÊSQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO
EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS G6 BAIANA**

NANASHARA COELHO DE CARVALHO

Orientadora: Prof^a Dr^a Milena Botelho Pereira Soares

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Elisalva Teixeira Guimarães

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Salvador – Bahia - Brasil
2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C331a

Carvalho, Nanashara Coelho de

Avaliação da atividade antineoplásica do extrato etanólico da própolis g6
baiana. [manuscrito] / Nanashara Coelho de Carvalho. - 2013.
68 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz,
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2013.

Orientador: Profª. Drª. Milena Botelho Pereira Soares, Laboratório de
Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

1. Melanoma. 2. Produtos naturais. 3. Própolis. I.Título.

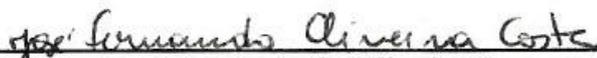
CDU 616-006.6:638.135

“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA
PRÓPOLIS G6 BAIANA”

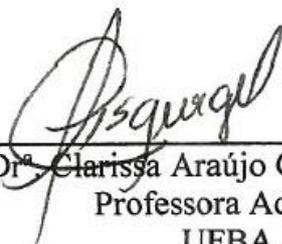
NANASHARA COELHO DE CARVALHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

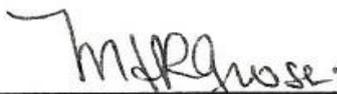
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. José Fernando de Oliveira Costa
Professor/Coordenador do Curso de Farmácia
UNIME



Dr. Clarissa Araújo Gurgel Rocha
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

FONTE DE FINANCIAMENTO:
Fiocruz

DEDICATÓRIA

Aos que lutaram ou lutam contra o câncer.

**“Ando devagar, porque já tive pressa e levo esse sorriso,
porque já chorei demais.”**

(Renato Teixeira)

AGRADECIMENTOS

- À Dr^a Milena Botelho Pereira Soares pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI);
- À Dr^a Elisalva Teixeira Guimarães (Liu) pela atenção, paciência, cumplicidade e amizade;
- À Dr^a Fabiana Regina Nonato e ao Professor Guilherme Gigliotti Neoneli por terem acreditado em mim. Serei eternamente grata!
- Ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa – CPqGM, aos membros do corpo docente e funcionários;
- À Dr^a Simone Garcia Macambira pelas palavras de incentivo e gentileza costumeiras;
- Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra pela confiança depositada, apoio indispensável e otimismo – um exemplo de profissional que ama e se dedica ao que faz!
- Aos **amigos** reconhecidos durante o mestrado e que tornaram essa caminhada mais leve: Wagno Alcântara Santana, Cássio Santana Meira, Helena Graziela Barreto da Silva, Clarissa Cunha Santana, Kelly Barbosa Gama e Milena da Silva Lima;
- Aos colegas do LETI pelas trocas de conhecimento, auxílio e momentos de descontração;
- À Taís Macedo Soares, Camilla Reis Augusto de Silva, Vanessa Ribeiro Matos, Gisele Graça Leite, Sayuri Rocha Yamashita e Maiana de Oliveira Cerqueira e Costa. A vida não poderia ter colocado em meu caminho pessoas mais maravilhosas...
- À minha mãe e irmã pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida. Sem vocês nada até aqui seria possível. Amo vocês!

Por fim, são muitos nomes, muitos rostos e significados... Por mais que eu busque palavras para evidenciar a minha gratidão, nenhuma será capaz de definir o que sinto, então, só me resta sentir com certeza!

CARVALHO, Nanashara Coelho de. Avaliação da atividade antineoplásica do extrato etanólico da própolis G6 baiana. 68 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada pelo processo proliferativo descontrolado de células transformadas. Devido à possibilidade de metástase, o melanoma cutâneo é considerado um dos cânceres mais agressivos. Produtos naturais derivados de plantas e outros organismos têm sido utilizados como fonte para o desenvolvimento de quimioterápicos empregados no tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive do melanoma. A própolis é um produto natural produzido por abelhas a partir de exudatos de brotos e botões florais, e apresenta uma composição química complexa que influencia sua atividade biológica. O presente trabalho propõe a investigação da atividade antineoplásica do extrato etanólico da própolis G6 baiana (EEPG6), que apresenta uma composição química distinta de outras própolis, principalmente pela ausência de flavonóides. A citotoxicidade do EEGP6 frente a diferentes linhagens neoplásicas foi determinada através do modelo de incorporação de timidina tritiada. O padrão de morte celular e a influência das espécies reativas de oxigênio foram avaliados em células da linhagem B16-F10 após tratamento com a EEGP6. A eficácia da própolis G6 em reduzir o desenvolvimento neoplásico foi determinada em camundongos da linhagem C57Bl/6 portadores de melanoma subcutâneo. Os resultados encontrados demonstram uma atividade do EEGP6 frente a diferentes linhagens malignas, com valores de CI_{50} variando entre 13,2 $\mu\text{g/mL}$ e 24,1 $\mu\text{g/mL}$. Através da dupla marcação com a anexina V e iodeto de propídio, e ensaio de ativação de caspase-3 foi possível determinar que o tratamento com o EEGP6 induz a morte celular por apoptose. Esses dados corroboram com o padrão morfológico de células, alteração do potencial transmembrânico mitocondrial, fragmentação do DNA e bloqueio do ciclo celular encontrados em células tratadas com a própolis G6 e que são alterações características da morte celular por apoptose. No modelo murino de melanoma subcutâneo, o tratamento com a EEGP6 na dose de 200 mg/kg foi capaz de inibir em cerca de 81,72% o peso médio dos tumores. Desse modo, a própolis G6 baiana revela-se como uma fonte de substâncias com potencial antineoplásico na terapia convencional.

Palavras chave: Melanoma, Produtos naturais, Própolis.

CARVALHO, Nanashara Coelho. Evaluation of the antineoplastic activity of the ethanol extract of G6 propolis from Bahia. 68 f. il. Dissertation (Masters) - Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Center, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Cancer is a disease process characterized by uncontrolled proliferation of transformed cells. Due to the possibility of metastasis, cutaneous melanoma is considered one of the most aggressive cancers. Natural products derived from plants and other organisms have been used as a source for the development of chemotherapeutic agents used in the treatment of various cancers, including melanoma. Propolis is a natural product produced by bees from exudates shoots and buds, and has a complex chemical composition that influence their biological activity. This study aims to investigate the anticancer activity of ethanol extract of G6 propolis from Bahia (EEPG6), which has a different chemical composition of other propolis, especially in the absence of flavonoids. The cytotoxicity of the EEPG6 against different neoplastic strains was determined using the model of tritiated thymidine incorporation. The pattern of cell death and the influence of reactive oxygen species were assessed in cell line B16-F10 after treatment with EEPG6. The effectiveness of propolis G6 in reducing neoplastic development was determined in mice of strain C57BL/6 bearing subcutaneous melanoma. The results demonstrate the EEP G6 activity against different strains malignant, with IC₅₀ values ranging from 13.2 mg/mL and 24.1 mg/mL. Through the double staining with Annexin V and propidium iodide, and testing the activation of caspase-3 was determined that treatment with EEPG6 induces cell death by apoptosis. These data corroborate with the cell morphology, alteration of mitochondrial transmembrane potential, DNA fragmentation and cell cycle arrest found in cells treated with propolis G6 and changes which are characteristic of apoptotic cell death. In a murine model of subcutaneous melanoma, treatment with EEPG6 at a dose of 200 mg/kg was able to reduce the average weight of the tumors in about 81.72%. Thus, G6 propolis from Bahia appears as a source of potential anticancer substances in conventional therapy.

Keywords: Melanoma, Natural products, Propolis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

μCi	<i>Microcurie</i>
ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis of Variance</i>)
CI_{50}	Concentração Capaz de Inibir 50% = Concentração Inibitória
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DCFH-DA	2'-7'-Diacetato de Diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Tetra-Acético Etilenodiamino
EEPG6	Extrato Etanólico da Própolis G6
E.P.M	Erro Padrão da Média
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
FACScalibur	<i>Fluorescence Activated Cell Analyser</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mM	Milimolar
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5]-difeniltetrazólio
NAC	<i>N</i> -acetil- <i>L</i> -cisteína
nm	Nanômetro
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PI	Iodeto de Propídio
RPMI	<i>Roswell Park Memoria Institute medium</i>
RPM	Rotação por Minuto
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RHOD	Rodamina
SBF	Soro Bovino Fetal
US-NCI	<i>United States National Cancer Institute</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	Câncer	13
2.2	Câncer de pele	14
2.3	Melanoma cutâneo	15
2.4	Terapias convencionais para o tratamento do câncer	15
2.4.1	<u>Terapias convencionais para o tratamento do melanoma</u>	19
2.5	Produtos naturais no tratamento do câncer	20
2.6	A própolis	21
2.6.1	<u>A própolis G6 baiana</u>	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Geral	26
3.1	Específicos	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Animais	27
4.1	Células	27
4.3	Cultivo celular	28
4.4	Própolis G6 baiana	28
4.5	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial citotóxico	28
4.5.1	<u>Avaliação da citotoxicidade em células tumorais</u>	28
4.5.2	<u>Avaliação da citotoxicidade em células normais</u>	29
4.6	Avaliação da atividade citotóxica do EEG6 e do seu mecanismo de ação em células B16-F10	30
4.6.1	<u>Avaliação da proliferação de células B16-F10 - método de MTT</u>	30
4.6.2	<u>Avaliação de proliferação celular e da influência de ROS após tratamento de células B16-F10 com EEG6 – Contagem por Trypan Blue</u>	30
4.6.3	<u>Análise morfológica – Coloração por hematoxilina e eosina</u>	31
4.6.4	<u>Análise morfológica por microscopia de fluorescência - Laranja de Acridina/ Brometo de Etídio (LA/BE)</u>	31
4.6.5	<u>Avaliação do perfil de morte celular – Externalização de fosfatidilserina</u>	31
4.6.6	<u>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</u>	32

4.6.7 <u>Ensaio de ativação de caspase-3</u>	32
4.6.8 <u>Análise do ciclo celular</u>	32
4.7 Avaliação da toxicidade aguda e atividade antineoplásica <i>in vivo</i> do EEPG6	33
4.8 Análise estatística	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> em células normais e em diferentes linhagens de células neoplásicas após tratamento com o EEPG6	35
5.2 Avaliação da atividade citotóxica do EEPG6 e do seu mecanismo de ação em células B16-F10	37
5.2.1 <u>Avaliação da proliferação de células B16-F10 - Método de MTT</u>	37
5.2.2 <u>Avaliação da viabilidade de células B16-F10 – Contagem por Trypan Blue</u>	38
5.2.3 <u>Análise morfológica - Coloração com hematoxilina-eosina</u>	39
5.2.4 <u>Análise morfológica por microscopia de fluorescência – Laranja de Acridina/ Brometo de Etídio (LA/BE)</u>	40
5.2.5 <u>Avaliação do perfil de morte celular – Externalização de fosfatidilserina</u>	41
5.2.6 <u>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</u>	42
5.2.7 <u>Ativação de Caspase-3</u>	43
5.2.8 <u>Análise do ciclo celular</u>	44
5.2.9 <u>Avaliação do efeito de ROS sob a atividade do EEPG6</u>	45
5.3 Avaliação da atividade antineoplásica do EEPG6 <i>in vivo</i>	46
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública e representa uma das causas mais relevantes de mortalidade no mundo (LOPEZ, 1990; JEMAL, et al., 2010; CHEN et al., 2013; GOMPEL et al., 2013; HUSSAIN & SULLIVAN, 2013). No Brasil, o tipo de câncer mais freqüente é o de pele, representando cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Dentre os três principais tipos de câncer de pele (melanoma, carcinoma basocelular e carcinoma escamocelular), o melanoma é considerado o mais grave devido à possibilidade de desenvolvimento de metástases, apesar de representar apenas 4% das neoplasias malignas deste órgão (INCA 2012). Em 2010, foram notificadas 1.507 mortes em decorrência desse tipo de câncer no Brasil e para o ano de 2012, as estimativas indicavam 6.230 novos casos da doença (INCA, 2012).

O melanoma é originado nos melanócitos e seu tratamento consiste na ressecção cirúrgica do tumor, associado à quimioterapia e à radioterapia. Quando há metástase, esta doença torna-se incurável na maioria dos casos (INCA, 2012). Células cancerosas frequentemente adquirem resistência à quimioterapia, devido ao aumento da capacidade de reparo do DNA e alterações nos mecanismos associados à morte celular (GATTI & ZUNINO, 2005). Além disso, os agentes quimioterápicos convencionais que atuam sobre a proliferação celular descontrolada, através da inibição da síntese de ácidos nucléicos, induzem efeitos colaterais indesejáveis (HOSKIN & RAMAMOORTHY, 2008) como náuseas, vômitos, imunossupressão, miocardiopatia, alopecia, carcinogênese, mutagênese, entre outros (DAUGSCH et al., 2007), por agirem de forma não-específica. Desse modo, o uso desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade (ALMEIDA et al., 2005).

Durante os últimos 30 anos, o rastreamento sistemático de milhares de extratos vegetais levou ao isolamento de vários agentes antineoplásicos, o que evidencia o interesse pelo reino vegetal como fonte de novas estruturas biologicamente ativas e toxicidade reduzida (KOCH, 1992).

A própolis é uma substância natural de aspecto resinoso produzida por abelhas a partir de exudatos de brotos e botões florais de diversas plantas, com composição química dependente da biodiversidade da região visitada pelas abelhas

(PAPOLO et al., 2009). Assim, a fonte botânica e a sazonalidade são fatores que consequentemente têm influência sobre as propriedades biológicas da própolis (SIMÕES-AMBRÓSIO et al., 2010).

Devido à composição química complexa e variável da própolis, suas atividades biológicas são distintas: antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, imunomodulatória, citotóxica, anticariogênica e antitumoral (CABRAL et al., 2009). Porém, ainda há escassez de informações científicas sobre os inúmeros tipos de própolis, visto que as mesmas são substâncias não-tóxicas bastante diversificadas e necessitam ser investigadas como fontes de novas substâncias bioativas (DAUGSCH et al., 2007).

Evidências baseadas na medicina complementar e alternativa têm demonstrado o uso de própolis para tratar ou apoiar o tratamento de diversas doenças (DAUGSCH et al., 2007). Recentes trabalhos demonstram que a própolis apresenta atividade contra diferentes linhagens tumorais *in vitro*, tem potencial de inibir o crescimento das células, induzir a apoptose e interferir no ciclo celular (PAPOLO et al., 2009; LIN et al., 2010; PRATSINIS et al., 2010).

No Brasil, a própolis foi classificada em doze tipos diferentes com base em suas características físico-químicas: cinco no grupo sul (grupo 3 = G3), seis no grupo nordeste (grupo 6 = G6) e um tipo nas regiões sudeste e centro-oeste (grupo 12 = G12), (PARK et al., 2002). A própolis G6 originada da Mata Atlântica da Bahia é distinta de outros tipos de própolis, especialmente devido à ausência de flavonóides e a presença de elementos apolares (CASTRO et al., 2009). Dentre as espécies vegetais visitadas pelas abelhas no litoral Norte da Bahia, uma das regiões de ocorrência da própolis tipo 6, destacam-se a *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth., *Conocliniopsis prasiifolia* (DC.) R.M.King & H.Rob., e a *Spermacoce verticillata* L. Elas são descritas na literatura por sua atividade antiinflamatória, analgésica, ação vasorelaxante e anticonvulsiva (ROSAS-ROMERO et al., 2002; SANTOS et al., 2007; MENEZES et al., 2007).

Neste contexto, o presente trabalho propõe a investigação do potencial antineoplásico do extrato etanólico da própolis G6 através da avaliação dos seus efeitos em modelo experimental de melanoma murino, bem como sua ação inibitória frente a diferentes linhagens neoplásicas *in vitro* e seu possível mecanismo citotóxico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer descreve um grupo heterogêneo de doenças que possuem como característica singular o surgimento de células anormais que proliferam descontroladamente, independentes de estímulos externos. Por outro lado, células normais gerenciam a produção de promotores do crescimento ou de fatores inibidores, garantindo o controle proliferativo e funcional do tecido (GUTSCHNER & DIEDERICHS, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), esse grupo de doenças é uma das principais causas de morte, levando a óbito cerca de 7,6 milhões de indivíduos (aproximadamente 13% de todas as mortes) no ano de 2008. Deste total, 70% das mortes ocorrem em países de baixa e média renda. As previsões indicam que esses números tendem a aumentar com uma estimativa de 13,1 milhões de mortes no mundo em 2030. Os principais tipos de câncer que levam a óbito são: pulmão (1,37 milhões), estômago (736 mil), fígado (695 mil), colorretal (608 mil), mama (458 mil) e câncer cervical (275 mil) (OMS, 2013).

Diversas alterações genéticas e epigenéticas direcionam células normais à malignidade. Tais alterações participam em vias oncogênicas, permitindo a proliferação e disseminação das células malignas (VALDESPINO-GÓMEZ & VALDESPINO-CASTILLO, 2010). Associados aos fatores genéticos existem componentes externos que contribuem para a carcinogênese, como: o uso do tabaco, o consumo de álcool, o hábito alimentar e sedentarismo (estes são considerados os principais fatores de risco exógenos para o desenvolvimento de câncer) (OMS, 2013). Além destes fatores, agentes físicos, como a radiação, e agentes biológicos, como os vírus podem influenciar o processo carcinogênico, induzindo mutações em genes que codificam oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor (RALPH et al., 2010; LUO et al., 2013). O envelhecimento é outro fator relacionado ao câncer, já que, quanto mais velho o indivíduo, maior o acúmulo de modificações genéticas (mutações somáticas) e suscetibilidade a alterações celulares malignas (INCA, 2012).

Para que as células cancerosas tornem-se independentes de sinais proliferativos, elas adquirem habilidades fisiológicas fundamentais, como:

autossuficiência na produção de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, resistência à morte programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

A apoptose é um mecanismo de morte celular essencial altamente conservado e importante para o desenvolvimento normal e a supressão da oncogênese (CUI et al., 2007). O processo apoptótico pode ser desencadeado por diferentes estímulos que resultam na ativação de caspases, através da via extracelular, por meio de receptores de membrana (e.g., fator de necrose tumoral – TNF e FAS) ou da via intracelular (via mitocondrial) Considerando que as alterações de vias apoptóticas são comuns em tumores, este processo torna-se um alvo para a terapia do câncer (RUFINI & MELINO, 2011).

2.2 Câncer de pele

O câncer de pele é comumente dividido em dois tipos: o não melanoma (carcinomas basocelular e escamocelular) e o melanoma. Aumentos rápidos nas taxas de incidência de neoplasias da pele têm sido observados (VAN DER GEER et al., 2013). O câncer de pele não melanoma é o mais incidente no Brasil, representando aproximadamente 1/5 dos casos novos de câncer. Sua taxa de mortalidade é uma das mais baixas por apresentar altos índices de cura. Por outro lado, o melanoma, responsável por apenas 5% dos casos de câncer de pele, apresenta uma alta letalidade pela sua capacidade de desenvolvimento de metástases (INCA, 2003).

Nos Estados Unidos, a cada ano, mais de 68.000 americanos são diagnosticados com melanoma e outros 48.000 são diagnosticados com uma forma precoce da doença que envolve apenas o epitélio de revestimento (carinoma *in situ*). Além disso, mais de 2 milhões de pessoas são tratadas para carinoma basocelular ou escamocelular (NCI, 2011).

A exposição à radiação ultravioleta (UV) é a causa dominante associada às neoplasias de pele. A principal medida adotada para a prevenção desses cânceres é a redução à exposição solar, embora haja incerteza quanto às variações no efeito desse fator, de acordo com a magnitude e o tempo da exposição. Para o melanoma, a incidência intermitente e cumulativa extensa ao sol, sobretudo na infância e adolescência, pode causar o maior risco (GOLDMAN & BENNETT et al., 2001). Este

tipo de câncer de pele pode surgir ainda em áreas aparentemente protegidas da exposição solar como as genitálias, por exemplo, contrariando o conhecimento convencional de que são associados à radiação UV (RAGNARSSON-OLDING, 2004).

2.3 Melanoma Cutâneo

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo, com elevado potencial metastático e resistência aos agentes citotóxicos. Diversas publicações têm demonstrado o aumento em suas taxas de incidência (HOANG & EICHENFIELD, 2000; FIGUEIREDO et al., 2003; ALGAZI et al., 2010), respondendo por 80% das mortes por câncer de pele (MORENO NOGUEIRA et al., 2013). O melanoma cutâneo pode ser curado se tratado prematuramente, revelando a importância do seu diagnóstico precoce (AZEVEDO & MENDONÇA, 1992). Ao evoluir para o estágio metastático, seu tratamento torna-se extremamente difícil e não há terapias atualmente disponíveis (FERRARI JÚNIOR et al., 2008; MANDALÀ & VOIT, 2013).

A proporção de tumores removidos em estágios iniciais tem aumentado principalmente em países onde há programas educacionais dirigidos aos profissionais da área médica e à população em geral, levando a uma taxa de sobrevivência em cinco anos para cerca de 90%. Contudo, dados nacionais revelam que a maioria dos diagnósticos de melanoma é feita em estágios avançados da doença, com poucas chances de sobrevivência (PEREGRINO et al., 2004).

O melanoma ocorre predominantemente entre caucasianos (PAILLOOR et al., 2012), ocupando o quinto lugar entre os tipos mais comuns de câncer quanto a diagnósticos novos da enfermidade em homens, e é o sétimo tipo mais comum em mulheres norte-americanas, com estimativas no ano de 2010 de 68.130 mil diagnósticos de melanoma nos EUA, com 8.700 mil mortes. Neste país, são gastos aproximadamente 1,9 bilhões de dólares a cada ano para o tratamento dessa doença (NCI, 2010). No Brasil, de acordo com dados do INCA, no ano de 2012 foram estimados 3.170 novos casos de melanoma cutâneo para homens e 3.060 novos casos para mulheres (INCA, 2012).

O melanoma é um tipo de câncer originado nos melanócitos (células produtoras de melanina) (INCA, 2012) que pode se iniciar tanto na pele como em outros tecidos pigmentados (olhos, intestinos, esôfago, meninges, mucosa oral e

anogenital) (NCI, 2012). A interação entre diversos fatores exógenos e endógenos é associada ao risco de desenvolvimento desse tipo de câncer: a exposição intermitente e cumulativa ao sol (cerca de 65% dos melanomas são relacionados à radiação UV); exposição química; a cor da pele e cabelos (peles claras e cabelos loiros ou avermelhados); alta propensão a queimaduras e baixa capacidade de bronzeamento; presença de nevus (mais de 50 nevus adquiridos), presença de nevus grandes maiores que 6 mm, xeroderma pigmentoso e imunossupressão (BANDARCHI et al., 2010).

O melanoma primário geralmente apresenta três fases clínicas e morfológicas de desenvolvimento: primeiro, os melanócitos transformados proliferam acima da membrana basal epidérmica; depois, invadem a derme papilar (fases de crescimento *in situ* e crescimento radial invasivo); por fim, adquirem a capacidade de crescimento tumoral (crescimento vertical) (GUERRY IV et al., 1993).

O melanoma cutâneo é subdividido em quatro tipos clínicos principais: melanoma expansivo superficial (mais frequente), melanoma nodular, melanoma lentiginoso e melanoma lentiginoso acral, sendo o diagnóstico baseado em avaliação clínica e análise anatomopatológica levando em consideração os níveis de Breslow (espessura vertical da lesão em milímetros), e os critérios de Clark (invasão tumoral nas diferentes camadas da pele) (CHARMICHAEL & WILSON, 1992; TOVO et al, 2005; SPATZ et al., 2010).

O melanoma expansivo superficial é o tipo mais comum (cerca de 50% - 75% dos casos) e pode ocorrer em qualquer local e idade. As lesões apresentam pigmentação variada e disseminação pagetóide na epiderme; o melanoma nodular (cerca de 15% - 35% dos casos) não apresenta fase de crescimento radial e pode ser nodular, polipóide ou pedunculado; o melanoma lentiginoso maligno representa cerca de 5% - 15% dos casos e ocorre em áreas da pele expostas ao sol, como a face e extremidades superiores de pacientes idosos. É caracterizado por atrofia epidérmica, com formação de ninhos celulares e extensão aos anexos cutâneos; o melanoma lentiginoso acral ocorre em superfícies palmar, plantar, leito ungueal. Ulcerações e melanoníquia podem ocorrer. Representa cerca de 5% - 10% dos casos, com maior incidência entre afro-descendentes e asiáticos (CLARK JR et al., 1969; BANDARCHI et al., 2010).

Tumores de pele melanoma apresentam aparência morfológica e imunofenotípica heterogênea e supõe-se que essa heterogeneidade está

relacionada a subclones geneticamente diferentes, evolução clonal e o microambiente do tumor. Essas características contribuem para a progressão tumoral e resistência aos tratamentos (KONG et al., 2010). A sequência de eventos em que melanócitos normais se transformam em células de melanoma ainda é mal compreendida, mas é sabido que a maioria dos melanomas cutâneos apresenta mutações ativadoras em proto-oncogenes NRAS ou BRAF, componentes da via de transdução de sinal Ras-Raf-Mek-Erk (MAPK) (MANDALÀ & VOIT, 2013), relacionada com a proliferação celular (SILVA et al., 2009).

Outra característica importante relacionada à célula de melanoma é a sua resistência a apoptose, que coincide com a baixa expressão de proteínas pró-apoptóticas. Deste modo, moléculas anti-apoptóticas podem proteger essas células da morte por apoptose além de acentuar seu fenótipo agressivo (PLÖTZ et al., 2013; HARTMAN et al., 2013). Nesses tumores, os componentes moleculares associados a apoptose incluem reguladores positivos (apoptóticos) e negativos (anti-apoptóticos). Os primeiros incluem moléculas como p53, Noxa, PUMA, Bax, TNF, TRAIL, Fas/ FasL, PITSLRE, interferons e o c/KIT/SCF. Os últimos incluem Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, NF-KB, survivina, livina e ML-IAP (HUSSEIN et al., 2003).

A resistência à quimioterapia em pacientes portadores de melanoma tem sido associada a efeitos de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (BEDIKIAN et al., 2006). O gene Bcl-2 codifica uma proteína integral da membrana mitocondrial externa envolvida no bloqueio da apoptose em alguns tipos celulares, como linfócitos (KORSMEYER, 1992; SUTTON et al., 2012; GENE, 2013).

2.4 Terapias convencionais para o tratamento do câncer

Os tratamentos disponíveis e comumente utilizados para o câncer são a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia e a remoção cirúrgica do tumor. A combinação dessas técnicas é necessária na maioria dos casos. Os agentes antineoplásicos mais empregados incluem os alquilantes polifuncionais como a mostarda nitrogenada, as nitrosuréias, a ciclofosfamida, a cisplatina e o bussulfan; os antimetabólitos como a 6-mercaptopurina, o 5-fluoruracil e o metotrexato; os antibióticos antitumorais como a mitomicina C, a actinomicina D, a daunorrubicina e a adriamicina; os inibidores mitóticos como a vincristina, vimblastina e o etoposídeo e outros agentes não agrupados em uma classe farmacológica específica, como a dacarbazina e a L-asparaginase (INCA, 2012), sumarizados na tabela 01.

Tabela 1. Agentes antineoplásicos mais empregados na clínica, seus mecanismos de ação, suas indicações e efeitos colaterais associados.

Classe Farmacológica	Agente Antineoplásico	Mecanismo de Ação	Indicações	Efeitos Colaterais Comuns
Alquilantes	Ciclofosfamida Clorambucil Mecloretamina Melfalan Tio-TEPA Bussulfan	Atuam ligando-se e inativando o DNA, inibindo a divisão celular.	Carcinoma, leucemia, linfomas, mieloma, neuroblastoma, neoplasias de ovário, seminoma de testículo	Náuseas e vômito; Depressão da medula óssea; Alopécia; Ulcerações nas mucosas; Alterações cutâneas; Hepatotoxicidade; Nefrotoxicidade; Cardiotoxicidade;
Antimetabólitos	Metotrexato Azauridina Citarabina 5-fluoruracil 6-mercaptopurina 6-tioguanina	Substituem ou interferem na utilização do metabólito essencial, são denominados também de antagonistas competitivos.	Carcinomas, leucemias, rabdomiossarcoma, neoplasias de ovário e sistema nervoso.	Anorexia; Alterações neurológicas; Necrose tecidual; Dor; Diarréia; Constipação intestinal etc.
Hormônios Esteróides	Fluoximesterona Propionato de testosterona Diethyl-estilbestrol Etil-estradiol Prednisona Prednisolona Hidroxiprogesterona Medroxiprogesterona	Efeito linfocítico (bloqueio de mitose), antiinflamatório, antiedematoso, diminuição da atividade secretora das células neoplásicas.	Neoplasias de próstata, mama e endométrio.	
Produtos Naturais	Vimblastina Vincristina Actinomicina D Adriamicina Bleomicina Mitomicina C Mitramicina L-asparaginase	Bloqueio da mitose impedindo a divisão celular; inibição da síntese de RNA.	Carcinomas, leucemias, linfomas, neuroblastoma, nefroblastoma, hepatomas, sarcomas de partes moles, rabdomiossarcoma, neoplasias do sistema nervoso.	
Outras	Hidroxiuréia Isótopos	Bloqueio da síntese de	Hodgkin, melanoma,	

radioativos Mitotano Procarbazina BCNU	DNA; alquilação; supressão da secreção aumentada de esteróides das supra-renais.	leucemia, carcinoma do córTEX adrenal.
---	--	--

Adaptado de AMATO NETO et al., 1975.

Modalidades atuais de tratamento do câncer utilizam diferentes agentes para bloquear etapas importantes envolvidas na divisão celular, assim como etapas específicas de vias moleculares que são vitais para a sobrevivência das células cancerosas. Entretanto, a utilização desses agentes pode ser limitada por efeitos tóxicos sob as células normais saudáveis (GUDDATI, 2012). Além disso, células neoplásicas podem adquirir resistência a múltiplas drogas (*MDR: multidrug resistance*), que pertencem a classes químicas distintas, mas que são lipofílicas como, por exemplo, as antraciclinas, os taxanos, as podofilotoxinas e os alcalóides da vinca (NOOTER & HERWEIJER, 1991).

A resistência adquirida a drogas e/ ou a resistência intrínseca primária é a maior causa de falha no tratamento do câncer (DIZDAREVIC & PETERS, 2011) e está associada à capacidade que as células têm em reduzir o acúmulo intracelular da droga através da expressão de genes *MDR* que codificam glicoproteínas de membrana que funcionam como “bombas” de efluxo para moléculas lipofílicas (CHIN, et al., 1989).

Apesar das pesquisas significativas a fim de compreender as doenças neoplásicas, a taxa de sucesso para medicamentos oncológicos é relativamente muito baixa. Um desafio importante é a concepção de novas substâncias químicas altamente seletivas para as células cancerosas de modo a minimizar os efeitos colaterais (DUTT & MADAN, 2013).

2.4.1 Terapias convencionais para o tratamento de melanoma

A dacarbazina foi aceita como medicamento padrão para o tratamento do melanoma em 1970, por induzir uma sobrevida de aproximadamente 7 meses (KUSHNIR & MERIMSKY, 2013). Pouco progresso no tratamento médico de melanoma metastático tem sido observado por causa da ausência de terapias sistêmicas efetivas, devido principalmente a resistência de células de melanoma a apoptose induzida por agentes terapêuticos, tais como a quimioterapia, irradiação, e

imunoterapia (ZHANG et al., 2006). Contudo, o entendimento da heterogeneidade molecular desta doença e a identificação dos vários mecanismos de resistência às terapias específicas apóiam fortemente o uso de abordagens terapêuticas combinatórias (HELFAND et al., 2001).

Apesar de extensivas pesquisas e sucesso parcial obtido pelo uso de análogos de platina, nitrosoureas, taxanos, alcalóides de vinca e citocinas, a quimioterapia sobre o melanoma invasivo ainda não é efetiva. Desse modo, a busca por novas terapias com maior eficácia e poucos efeitos colaterais são necessárias (JANJETOVIC et al., 2011).

O vemurafenibe (Zelboraf®), um inibidor de proteínas oncogênicas BRAF V600 e membros da família RAF quinases (ARAF, BRAF e CRAF), foi aprovado pela FDA em 2011 para o tratamento de pacientes com melanoma mutante BRAF V600 irressecável ou metastático (RAVNAN & MATALKA, 2012; DIAS et al., 2013). Contudo, esse inibidor RAF está associado à aquisição de resistência por células de melanoma BRAF-selvagem e a efeitos colaterais (LE et al., 2013).

2.5 Produtos naturais no tratamento do câncer

Os produtos naturais são uma das fontes mais ricas na obtenção de substâncias eficazes na quimioterapia (CURT, 1996). Estratégias para amenizar ou reverter processos carcinogênicos através da utilização de substâncias naturais ou sintéticas, individualmente ou como terapias combinadas, emergiram como uma abordagem promissora para reduzir o risco de câncer (CHATURVEDI et al., 2008). Cerca de 70% das substâncias anticâncer conhecidas são produtos naturais ou derivados destes (KARIKAS, 2010).

Em particular, plantas representam a base da medicina tradicional, sendo utilizadas há milênios por diversas sociedades com os primeiros registros datando de cerca de 2600 AC., na Mesopotâmia, e que ainda têm grande importância para o tratamento de diversas doenças, inclusive para o tratamento do câncer (CRAGG & NEWMAN, 2013). O potencial de produtos naturais como agentes anticâncer foi reconhecido na década de 1950 pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI), que já identificou cerca de 3000 espécies de plantas que demonstraram atividade anticancerígena. Desde então, vários estudos tem contribuído para a descoberta de novos produtos naturais com tal potencial (DESAI et al., 2008; FERREIRA et al., 2011).

Os antimitóticos mais estudados têm origem vegetal, como os taxanos (paclitaxel e docetaxel) e os alcalóides da vinca (vincristina e vinblastina) cujo alvo celular são os microtúbulos do fuso mitótico (RAO et al., 2012). Estes, quando estão comprometidos, desaceleram ou bloqueiam a mitose e induzem a apoptose (JORDAN & WILSON, 2004). Um composto sintético derivado da cantaridina, substância encontrada em besouros (*Mylabris*), foi ativa na indução da apoptose sob linhagens humanas de carcinoma hepatocelular (CHIEN et al., 2002).

O potencial quimiopreventivo de substâncias de origem vegetal para o câncer, está relacionado à grande variabilidade de efeitos biológicos induzidos por esses compostos como a capacidade antioxidante, antiinflamatória, reguladora do sistema imune e hormonal, a supressão da proliferação celular e da angiogênese e a indução da apoptose (KHAN et al., 2008; ARAVINDARAM & YANG, 2010; GULLET, et al., 2010; VADODKAR et al., 2012; WANG et al., 2012; PRATHEESHKUMAR et al., 2012).

2.6 A própolis

A própolis é uma substância natural de característica resinosa produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* Linnaeus, a partir de exudatos vegetais derivados de várias fontes botânicas, contendo em sua composição cera e saliva de abelhas. É utilizada na colméia como componente vedante, além de proteger contra a invasão de intrusos (FRANCHI et al., 2012; SAWICKA et al., 2012).

A própolis é um dos poucos apoterápicos que manteve sua popularidade durante um longo período de tempo (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Os registros do seu uso pela medicina popular datam de 300 AC. (BANSKOTA et al., 2001). Devido a sua propriedade antiputrefante, a própolis era utilizada pelos egípcios nos processos de embalsamamento, para preservar seus mortos. Gregos e romanos usavam a própolis como antisséptico e cicatrizante; os incas, como um agente antipirético e farmacopéias londrinas do século 17 listavam a própolis como um medicamento oficial (SFORCIN & BANKOVA, 2011).

Nos dias atuais, a própolis tem sido utilizada por muitos povos no preparo de alimentos e bebidas com a finalidade de melhorar ou prevenir doenças como o diabetes mellitus, inflamações, doenças cardíacas e câncer (BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 1998). A partir do conhecimento empírico sobre as suas propriedades medicinais, a própolis tem sido alvo de diversos estudos científicos

com a finalidade de elucidar suas propriedades químicas e biológicas, determinando assim, suas possíveis substâncias ativas e mecanismos de ação (SFORCIN et al., 2005).

A própolis bruta coletada de uma colméia de *A. mellifera* é uma mistura de componentes, apresentando em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (MONTI et al., 1983; CIRASINO et al., 1987 *apud* MENEZES, 2005). As características químicas de uma própolis são variáveis, sendo determinadas pelas espécies de abelhas envolvidas na sua produção e por condições fitogeográficas onde a colméia está inserida, assim como por mudanças sazonais, que, por fim, podem interferir em suas propriedades biológicas (DUARTE et al., 2003; KUMAZAWA et al., 2004; SIMÕES-AMBRÓSIO et al., 2011).

Um grande número de trabalhos publicados nos últimos anos relata as diferentes propriedades biológicas da própolis provenientes de diversas regiões: atividade antiinflamatória e imunomodulatória (MACHADO et al., 2012), antioxidante (CIGUT et al., 2011), antiviral (SHIMIZU et al., 2008), antifúngica (QUINTERO-MORA et al., 2008), antibacteriana (DIAS et al., 2012), citotóxica e antitumoral (NOMURA et al., 2001; EL-KHAWAGA et al., 2003; TEERASRIPREECHA et al., 2012), dentre outras.

Os principais compostos químicos isolados das própolis, no geral, são classificados como ácidos alifáticos e aromáticos, flavonóides, alcoóis, ácidos graxos, terpenos, açúcares, aminoácidos e diversos minerais (MENEZES, 2005; BANKOVA, 2005; SAWICKA et al., 2012). A tabela 2 mostra os principais componentes químicos geralmente encontrados em própolis, assim como alguns tipos de própolis mais estudados, suas origens geográficas e seus constituintes químicos principais.

Tabela 2. Composição química geral de própolis, tipos de própolis mais difundidos, assim como suas origens geográficas e seus constituintes químicos principais.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA GERAL (%)	TIPOS DE PRÓPOLIS MAIS DIFUNDIDOS	ORIGEM GEOGRÁFICA	PRINCIPAIS CONSTITUINTES
Ácidos graxos e Alifáticos (24-26%): Ácido glucônico, ácido fosfórico, ácido	Álamo	Europa América do Norte Regiões não-	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonas • Flavononas • Ácidos cinâmicos e

isofelúrico, ácido glutâmico etc.		tropicais da Ásia Nova Zelândia Brasil	seus ésteres
Ácidos aromáticos (5-10%): Ácido benzóico, ácido caféico, ácido cinâmico, ácido felúrico.	Verde (alecrim) Brasileira		<ul style="list-style-type: none"> • Ácidos <i>p</i>-cumarínicos prenilados • Ácidos diterpenos
Alcoóis e Terpenos (2-3%): Glicerol, α -cedrol, xilitol, eritritol etc.	Bétula	Rússia	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonas e flavonóides
Flavonóides (18-20%): Crisina, apigenina, galangina, astaxantina etc.	Vermelha	Brasil Cuba México	<ul style="list-style-type: none"> • Isoflavonóides
Açúcares (15-18%): D-altrose, D-glucose, maltose, D-frutose, arabinopiranosose etc.	Mediterrânea	Sicília Grécia Creta Malta	<ul style="list-style-type: none"> • Diterpenos
Ésteres (2-6%): Ácido caféico fenetil éster, ácido cinâmico, 3-metoxi-4-cinamato etc.	“Clusia”	Cuba Venezuela	<ul style="list-style-type: none"> • Benzofenonas polipreniladas
Vitaminas (2-4%): A, B1, B2, E, C, PP			
Microelementos (0,5-2%): Alumínio, cobre, magnésio, cromo, níquel, ferro, manganês etc.	“Pacífico”	Regiões do Pacífico (Okinawa, Taiwan, Indonésia)	<ul style="list-style-type: none"> • C-fenil-flavononas
Outros (21-27%): Cicloexanona, ciclopenteno, butano, L-prolina, guanidina etc.			

Tabela adaptada de (SFORCIN e BANKOVA, 2011; SAWICKA et al., 2012).

O CAPE (ácido caféico), um ácido aromático constituinte da própolis, foi

capaz de induzir a apoptose e suprimir a transformação tumoral de células (NOMURA et al., 2001). Outros estudos demonstraram a atividade anticancerígena de flavonóides (SUN et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Uma grande variedade de terpenóides (terpenos), fitoquímicos de origem natural usados tradicionalmente pela medicina popular chinesa e indiana, têm exibido citotoxicidade sobre vários tipos de células tumorais, além de prevenir e tratar diversos tipos de cânceres (RABI & GUPTA, 2008; THOPPIL & BISHAYEE, 2011).

Recentes trabalhos evidenciam o potencial citotóxico de extratos etanólicos de própolis sobre células de glioblastoma humano, assim como seu efeito sinérgico junto à termozolamida (BORGES et al., 2011; MARKIEWICZ-ZUKOWWSKA et al., 2013), aumentando a atividade inibitória desse alquilante no tratamento de tumores cerebrais e melanoma metastático (NAJMAN & GADELHA, 2002). Embora vários estudos demonstrem diversas atividades biológicas da própolis ou de seus componentes isolados, ainda não existem dados que revelem a utilidade dessas substâncias na clínica (SFORCIN & BANKOVA, 2011). Paradoxalmente, devido a tantas atividades biológicas simultâneas atribuídas a própolis, existe a desconfiança de médicos e outros profissionais em relação a eficácia da mesma (PEREIRA et al., 2002).

2.6.1 A própolis G6 baiana

No Brasil, as própolis de *A. mellifera* foram classificadas em 12 tipos, de acordo com suas características físico-químicas e regiões de origem: cinco tipos da região sul; seis tipos da região nordeste; um tipo das regiões sudeste e oeste brasileira (PARK et al., 2002).

A própolis brasileira do grupo seis, obtida da região de Mata Atlântica do Estado da Bahia, na região nordeste do Brasil (própolis G6), possui características distintas de outros tipos de própolis, principalmente pela ausência de flavonóides e presença de ácidos graxos (DUARTE et al., 2003; CASTRO et al., 2009).

Embora os flavonóides sejam considerados um dos principais componentes antimicrobianos da própolis (FERREIRA JÚNIOR et al., 2006), uma sub-fração caracterizada como uma benzofenona poliprenilada foi identificada e apresentou uma importante atividade antimicrobiana em *S. aureus* e *S. mutans*, através da inibição de glucosiltransferases *in vitro* (DUARTE et al., 2003; CASTRO et al., 2009). PARDO-ABREU e colaboradores (2011), demonstraram a atividade citotóxica da gutiferona-A (uma benzofenona poliprenilada) sobre células HepG2 de carcinoma

hepático humano.

O potencial inibitório do extrato etanólico obtido de amostras da própolis verde coletada no estado de São Paulo foi testado sobre células HEp-2 de carcinoma laríngeo, demonstrando efeito citotóxico (BÚFALO et al., 2007). Em outro trabalho, MESSERLI e colaboradores (1997) avaliaram o efeito do extrato etanólico seco da própolis verde e de um dos seus principais componentes, a artepilina-C, sob a inibição do desenvolvimento de neurofibroma humano em modelo xenográfico murino, assim como sob o bloqueio das proteínas oncogênicas PAK1.

Trabalhos têm evidenciado o potencial inibitório das própolis brasileiras e de alguns dos seus componentes sobre diversos tipos de células neoplásicas, como demonstradas por LI e colaboradores (2008). De acordo com KAMIYA e colaboradores (2012), o extrato etanólico da própolis vermelha brasileira e seu componente isolado, o ácido caféico éster fenetil é capaz de induzir apoptose em células de carcinoma mamário MCF-7. Ainda não existem estudos semelhantes que demonstrem estas atividades biológicas para a própolis G6 originada da região de Mata Atlântica, situada no Estado da Bahia, Brasil, embora a atividade antimicrobiana de uma substância isolada a partir da própolis G6 baiana já tenha sido relatada por CASTRO e colaboradores (2009).

3 OBEJTIVOS

3.1 Geral

Investigar o potencial da própolis G6 baiana em inibir a proliferação de células neoplásicas *in vitro* e em modelo experimental de melanoma.

3.2 Específicos

- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* do extrato etanólico da própolis G6 sob células neoplásicas e células normais;
- Avaliar o efeito da própolis G6 sobre os mecanismos de apoptose em células B16-F10.
- Avaliar a toxicidade e o efeito do extrato etanólico da própolis G6 sob o desenvolvimento neoplásico em modelo experimental de melanoma subcutâneo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 machos e fêmeas, com idade entre 08 – 12 semanas, fornecidos pelo CPqGM/Fiocruz. Os animais foram mantidos no biotério da instituição, em sala climatizada com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}$ C), ciclo claro/ escuro de 12 h, água e alimentação *ad libitum* durante todo o período do experimento. O número de animais utilizado foi reduzido ao mínimo cientificamente aceito. Os protocolos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do CPqGM, sob o nº L-IGM-012/ 09.

4.2 Células

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e atividade antineoplásica foram doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil e estão listadas quanto ao histotipo e origem na tabela 3.

Tabela 3. Células utilizadas nos ensaios *in vitro*.

LINHAGEM	HISTOTIPO	ORIGEM
HepG2	Carcinoma hepatocelular	Humana
HL-60	Promieloblasto/ Leucemia promielocítica aguda	Humana
K562	Mieloblasto/ Leucemia mielogênica crônica	Humana
Daudi	Linfoblasto/ Linfoma de Burkitt	Humana
B16-F10	Melanoma	Murina
Esplenócitos	Linfócitos, macrófagos e outros	Murina
PBMC	Linfócitos	Humana

4.3 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram mantidas em garrafas de polipropileno, contendo meio RPMI 1640 (Life Technologies, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA), em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio ótico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse alcançado, ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens

aderentes (HepG2 e B16-F10), foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) para destacar as células das garrafas de cultura.

4.4 Própolis G6 baiana

Amostras brutas de própolis G6 produzida por abelhas *Apis mellifera*, originadas da área de Mata Atlântica, cidade de Entre Rios, Bahia, S 11° 56'68 e WO 38° 04'94, na região nordeste brasileira foram coletadas nos meses de outubro, nos anos de 2010 e 2011. Após a coleta das amostras de própolis, todo o material foi armazenado a -20°, enviado para processamento, análise química e produção do extrato etanólico no Laboratório de Bioquímica, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (ESALQ – USP), sob supervisão do Doutor Severino Matias de Alencar.

4.5 Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico

A avaliação da atividade citotóxica do EEG6 foi realizada em quatro linhagens tumorais humanas (HepG2, HL-60, K562, Daudi) e em uma linhagem de melanoma murino (B16-F10). Além das linhagens tumorais, culturas primárias de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 saudáveis e células mononucleares humanas de sangue periférico foram utilizadas. O ensaio foi realizado através do método de incorporação de metil-[³H]-timidina ou timidina tritiada. A doxorubicina foi usada como controle positivo (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e as culturas não-tratadas com as substâncias avaliadas receberam apenas o veículo utilizado para solubilizá-las (1% de DMSO, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

Inicialmente, células da linhagem B16-F10 e HepG2 foram adicionadas a placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL) e incubadas por 24 horas para aderência. Culturas de células não aderentes (HL-60, K562 e Daudi) também foram realizadas após este período ($0,3 \times 10^6$ células/mL). Todas as culturas foram tratadas por um período de 72 horas com as substâncias a uma concentração inicial de 100 µg/mL. Seis diluições subsequentes em triplicatas numa proporção de 1:3 foram realizadas. Para a avaliação da cinética proliferativa, três períodos foram estabelecidos: 24, 48 e 72 horas pós-tratamento. A timidina tritiada (1 µCi/ poço) foi adicionada às culturas 6

horas antes do término de cada tempo de tratamento citado. Posteriormente, as células foram transferidas para placas-filtro com o auxílio de um coletor de células (Brandel, Inc. Gaithersburg, MD, EUA), onde permaneceram por um período de 24 horas para a secagem dos filtros e 50 µL de um líquido cintilador Hidex Maxilight (PerkinElmer Life Sciences, Groningen, GE, Netherlands) foram adicionados aos poços. A incorporação de timidina tritiada foi obtida através de um contador-β CHAMELEON V (Mustionkatu 2, TURKU, Finland) e mensurada pelo *software* MikroWin Hidex 2000 v. 4.38 (Microtek Laborsysteme GmbH, Overath, Germany). O percentual antiproliferativo foi determinado pela relação da radioatividade expressada pelas células tratadas e não tratadas, assim como os valores da CI_{50} (concentração da droga capaz de inibir 50% da população exposta).

4.5.2 Avaliação da citotoxicidade em células normais

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos em células normais obtidas por culturas primárias, 3×10^6 esplenócitos/mL de camundongos da linhagem C57Bl/6 e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) na densidade $0,3 \times 10^6$ células/mL foram utilizadas. As células foram adicionadas a placas de 96 poços e, após 24 horas, o tratamento e outras etapas do procedimento experimental ocorreram como descritos previamente no item 4.5.1.

- **Obtenção de PBMC**

Amostras de sangue foram coletadas e por protocolo padrão de gradiente de densidade com uso de Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia), as células mononucleares foram isoladas. Após a separação, as PBMCs foram lavadas duas vezes com solução salina a 0,9%, ressuspensas na densidade desejada em meio RPMI suplementado com 20% de SBF e 50 µg/mL de gentamicina. Para induzir a divisão celular de linfócitos, 10 µg/mL de concanavalina-A (ConA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foram adicionadas às culturas.

- **Obtenção de esplenócitos**

Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram eutanasiados em câmara de CO_2 , os baços foram retirados por incisão cirúrgica e adicionados a placas de Petri contendo 8 mL de meio RPMI e 50 µg/mL de gentamicina. Com o auxílio do êmbolo de seringa estéril, os baços foram macerados, as células foram lavadas com meio RPMI, ressuspensas na densidade desejada em meio RPMI, suplementado com 20% de SBF e 50 µg/mL de gentamicina.

4.6 Avaliação da atividade citotóxica do EEPG6 e do seu mecanismo de ação em células B16-F10

Para os ensaios que se seguem, células da linhagem B16-F10 ($0,7 \times 10^5$ células/ mL) foram tratadas após um período inicial de 24 horas em estufa a 37° C e a 5% de CO₂ com concentrações do EEPG6 (12,5; 25 e 50 µg/mL) previamente estabelecidas com base no valor da CI₅₀ (25 µg/mL). A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como droga de referência e o grupo controle negativo recebeu apenas o veículo (0,1% DMSO) usado para solubilizar as substâncias testadas. O tratamento ocorreu por um período de 24 horas, com exceção do experimento descrito abaixo, no item 4.6.1.

4.6.1 Avaliação da proliferação de células B16-F10 - método de MTT

Células B16-F10 foram adicionadas a placas de 96 poços e tratadas por 24, 48 e 72 horas. Ao término de cada período de incubação, as placas foram centrifugadas por 1500 rpm e 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e cada poço recebeu 150 µL de meio fresco (RPMI 1640 sem fenol red, GIBCO) contendo 0,5 mg/mL de MTT (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA). As placas foram incubadas por mais 3 h e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi desprezado e para solubilizar o precipitado de formazan gerado, 150 µL de DMSO foram adicionados aos poços. A absorbância correspondente ao número de células viáveis foi mensurada após 30 minutos em espectrofotômetro (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices, EUA) a 595 nm (MARINHO-FILHO et al., 2010).

4.6.2 Avaliação da viabilidade celular e da influência de ROS após tratamento de células B16-F10 com EEPG6 – Contagem por Trypan Blue

Células B16-F10 foram adicionadas a placas de 24 poços por um período de 24 h para atingirem confluência. Após este período, as células foram tripsinizadas (tripsina a 0,25%), centrifugadas por 1500 rpm e 10 minutos, lavadas e ressuspendidas em 90 µL de meio e 10 µL do corante *trypan blue*. Para avaliar a interferência de ROS sobre o efeito da EEPG6, as células foram pré-tratadas com um agente antioxidante: NAC (N-acetil-L-cisteína) a 5 mM, 1 h antes das substâncias serem adicionadas. Em seguida, a contagem (100 células por amostra) foi realizada levando em consideração a exclusão do *trypan* por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio ótico (Olympus CX41). A porcentagem de células viáveis foi determinada em relação ao controle não tratado.

4.6.3 Análise morfológica – Coloração por hematoxilina e eosina

Após o período de tratamento com o EEPG6, células B16-F10 foram tripsinizadas e uma alíquota (90 µL) de cada amostra foi citocentrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. A fixação das células foi realizada com metanol por 1 minuto, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, e então, com o auxílio de microscópio ótico (OlympusBX41, Tóquio, Japão) as alterações morfológicas foram avaliadas (FERREIRA *et al.*, 2011).

4.6.4 Análise morfológica por microscopia de fluorescência - Laranja de Acridina/ Brometo de Etídio (LA/BE)

Após o período de tratamento de 24 h, as células B16-F10 foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado após centrifugação. As células foram ressuspendidas em 20 µL de meio. Uma solução (2 µL) contendo 100 µg/mL de laranja de acridina/ LA (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) e brometo de etídio/ BE (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) foi adicionada às amostras. A análise dos tipos celulares presentes foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX41), através de contagem diferencial de 300 células por amostra, seguindo a classificação: células viáveis, células apoptóticas e células em apoptose tardia/ necróticas.

4.6.5 Avaliação do perfil de morte celular – Externalização de fosfatidilserina

A avaliação do perfil de morte celular (apoptose/ necrose) foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. Células B16-F10 foram tratadas com o EEPG6. Após o tratamento, as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) (BioSource, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur através *software CellQuest* (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de anexina quantificada, após a exclusão das células positivas para iodeto de propídio (necrose/ apoptose tardia).

4.6.6 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Após o tratamento por 24 h com o EEPG6, células B16-F10 foram diluídas numa solução de rodamina 123 (5µg/mL em salina a 0,9%) e incubadas a 37°C na ausência de luz por 15 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e uma incubação adicional de 30 minutos, no escuro a 37°C

em salina a 0,9% foi realizada. Logo em seguida, a emissão de fluorescência foi detectada por citometria de fluxo.

4.6.7 Ensaio de ativação de caspase-3

A atividade de caspase-3 foi avaliada através do kit colorimétrico de protease, de acordo com as recomendações do fabricante (BioVision). O método é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilida (pNA) após clivagem dos substratos X-pNA, onde X representa a seqüência de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-pNA para a caspase-3. Inicialmente, células B16-F10 tratadas com o EEPG6 por 24 h foram centrifugadas e lisadas em gelo. A quantidade de proteína no lisado foi determinada utilizando-se o ensaio para dosagem de proteína pelo método já descrito por Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, 100 µg de proteínas foram incubadas com o substrato em placa de 96 poços. A densidade óptica das amostras foi medida a 405 nm em espectrofotômetro.

4.6.8 Análise do ciclo celular

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI (iodeto de propídio) como agente fluorogênico. Após 24 h de tratamento com o EEPG6, o sobrenadante foi coletado, os poços foram lavados com solução salina a 0,9% de NaCl, as células foram tripsinizadas (tripsina EDTA a 0,25%) e centrifugadas juntamente com o sobrenadante por 5 minutos e 1200 rpm. As células foram diluídas com a solução de lise (200 µL) contendo 0,1 % de triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS, na ausência de luz e a 37°C. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA) através do software *CellQuest*.

4.7 Avaliação da toxicidade aguda e atividade antineoplásica *in vivo* do EEPG6

• Avaliação da toxicidade aguda do EEPG6

Antes da indução do modelo de tumor cutâneo, concentrações diferentes (200 – 1600 mg/kg) do EEPG6 foram utilizadas com o objetivo de determinar a dose letal para 50% (DL₅₀) dos animais tratados – Teste de toxicidade aguda. A avaliação foi feita com base em sinais tóxicos de caráter geral (tremor, convulsão, piloereção, ptose, efeitos sobre a respiração, movimentação, tônus muscular e morte),

apresentados pelos animais após 24 h da administração oral do EEPG6.

- **Avaliação da atividade antineoplásica *in vivo* do EEPG6**

Para avaliar a atividade antineoplásica do EEPG6, células B16-F10 (5×10^5 células/ 0,2 mL) foram injetadas pela via subcutânea no dorso de camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6, com idade entre 8 – 12 semanas. Os camundongos foram divididos em quatro grupos, cada um composto por 10 animais: o grupo veículo foi tido como o controle negativo e recebeu 100 µL de propilenoglicol; os grupos EEPG6 foram tratados com o extrato da própolis nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg (o extrato foi solubilizado em uma solução de propilenoglicol e álcool etílico, em porcentagens de volumes de 95% e 5%, respectivamente); o quarto grupo recebeu uma droga de referência já usada na clínica para o tratamento de diversas neoplasias malignas, a ciclofosfamida, na dose de 20 mg/kg. A ciclofosfamida foi solubilizada em solução salina a 0,9% de NaCl. A relação dos grupos está sumarizada na tabela 4. O tratamento foi realizado durante os 14 dias consecutivos após o dia do transplante, com administração diária por via oral. Após 14 dias de tratamento, todos os animais foram eutanasiados, sendo realizada prévia anestesia com 10 mg/kg de xilazina (Cristália, SP, Brasil) e 90 mg/kg de quetamina (Vertbrands, SP, Brasil). Os tumores foram retirados e fixados em formol a 10% em placas de petri, para mensuração das massas.

Tabela 4. Identificação dos grupos experimentais definidos para a avaliação *in vivo* da atividade antineoplásica do EEPG6.

GRUPO	DOSE/ VOLUME ADMINISTRADO	VIA DE ADMINISTRAÇÃO
Veículo/Controle Negativo (CN)	100 µL	ORAL
EEPG6 (200)	200 mg/Kg (100 µL)	ORAL
EEPG6 (100)	100 mg/Kg (100 µL)	ORAL
Ciclofosfamida / Controle Positivo (CP)	20 mg/Kg (100 µL)	ORAL

4.8 Análise Estatística

Os dados foram comparados por ANOVA seguida pelos testes de Bonferroni ou Tukey ($p < 0,05$), apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os valores de CI_{50} foram obtidos por regressão não linear, através do programa GRAPHPAD PRISM 5.01 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro* em células normais e em diferentes linhagens de células neoplásicas após tratamento com o EEPG6

A tabela 5 apresenta os valores de CI_{50} encontrados no ensaio de citotoxicidade da própolis G6 e da doxorrubicina sobre células normais e diferentes linhagens de células neoplásicas. A própolis G6 foi citotóxica para todas as linhagens neoplásicas, com valores de CI_{50} que variaram de 13,2 $\mu\text{g/mL}$ a 24,1 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens de HepG2 e B16-F10, respectivamente. A doxorrubicina, utilizada como droga de referência, também apresentou citotoxicidade em todas as linhagens tumorais testadas, com valores de CI_{50} que variaram de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ a 2,3 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens de HepG2 e Daudi, respectivamente.

Ao analisar a atividade citotóxica da própolis G6 sobre células normais foram encontrados valores de CI_{50} para o EEPG6 de 15,9 $\mu\text{g/mL}$ para esplenócitos e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ para células do sangue periférico (PBMC). Para a doxorrubicina, o valor de CI_{50} foi de 4,3 $\mu\text{g/mL}$ para esplenócitos, enquanto que para PBMC, o valor de CI_{50} foi de 3,4 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados demonstram que o extrato avaliado não apresenta seletividade em relação às linhagens neoplásicas testadas.

Apesar do EEPG6 ter apresentado valores de CI_{50} considerados satisfatórios para todas as linhagens neoplásicas testadas, os experimentos subsequentes foram realizados com células da linhagem B16-F10 de melanoma, pelo seu alto potencial metastático e pela possibilidade dessa linhagem ser avaliada tanto *in vitro* como *in vivo*.

Tabela 5. Atividade citotóxica do EEPG6 e da doxorrubicina sobre linhagens de células neoplásicas e em células normais.

Linhagem Celular	CI ₅₀ (µg/mL) ± E.P.M (Erro Padrão da Média)	
	EEPG6	Doxorrubicina
*B16-F10	24,1 ± 1,3	0,4 ± 0,2
HepG2	13,2 ± 1,4	0,2 ± 0,05
Daudi	19,8 ± 1,8	2,3 ± 0,6
HL-60	20,8 ± 1,8	0,9 ± 0,2
K562	16,4 ± 4,2	1,6 ± 0,3
*Esplenócito	15,9 ± 0,9	4,3 ± 1,9
PBMC	10,0 ± 1,4	3,4 ± 0,9

Valores de CI₅₀ ± E.P.M de três experimentos independentes realizados em triplicata.

*Células de origem murina.

5.2 Avaliação da atividade citotóxica do EEGG6 e do seu mecanismo de ação em células B16-F10

5.2.1 Avaliação da proliferação de células B16-F10 - Método de MTT

A figura 1 apresenta os valores de proliferação de células B16-F10 tratadas com EEGG6 (12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e a doxorrubicina. De acordo com os dados obtidos nesse ensaio é possível afirmar que o EEGG6 nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir de modo significativo a proliferação celular quando comparadas ao controle não tratado, em todos os tempos avaliados. Na menor concentração (12,5 $\mu\text{g/mL}$) testada, o EEGG6 inibiu a proliferação celular de modo significativo em relação ao controle não tratado a partir do tempo de 48 h. A doxorrubicina a 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (droga de referência) inibiu a proliferação de B16-F10 significativamente após 24 h e 72 h de tratamento quando comparada ao controle.

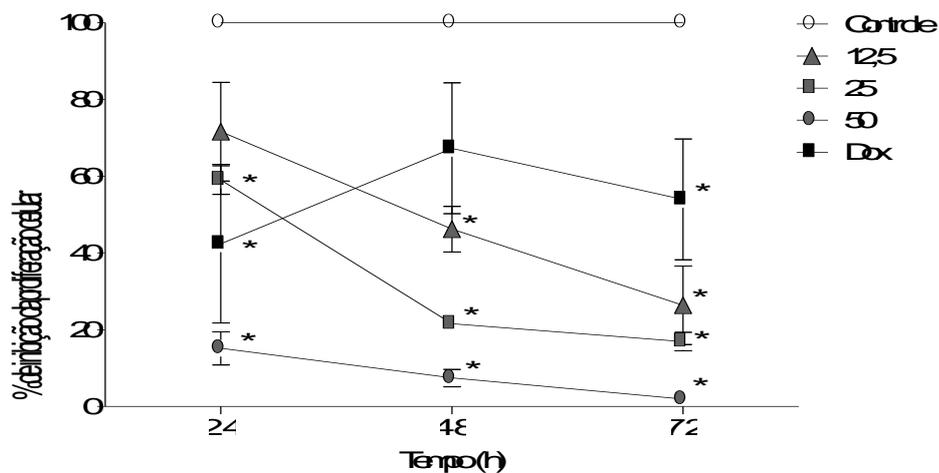


Figura 1. Inibição da proliferação de células B16-F10 tratadas com o EEGG6. Células foram tratadas com diferentes concentrações do EEGG6 (12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$). A proliferação celular foi observada com base nos valores de conversão de MTT. A doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como droga de referência e o controle negativo foi tratado com o veículo (0,1 % DMSO) utilizado para solubilizar as substâncias. A inibição da proliferação celular foi observada em três tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas). Os dados representam a média \pm E.P.M de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

5.2.2 Avaliação da viabilidade de células B16-F10 – Contagem por Trypan Blue

A viabilidade de células B16-F10 foi realizada com a finalidade de confirmar o efeito antiproliferativo do EEPG6, com base na exclusão do corante *trypan blue*. De acordo com a figura 6 é possível observar uma redução significativa do número de células viáveis quando tratadas com as maiores concentrações do EEPG6, assim como, quando tratadas com a doxorrubicina (0,3 µg/mL). Após 24 horas de tratamento com as concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, houve uma redução da viabilidade celular em aproximadamente 45% e 60%, respectivamente, quando comparado ao controle negativo. A menor concentração (12,5 µg/mL) do EEPG6 não foi capaz de reduzir significativamente o número de células viáveis.

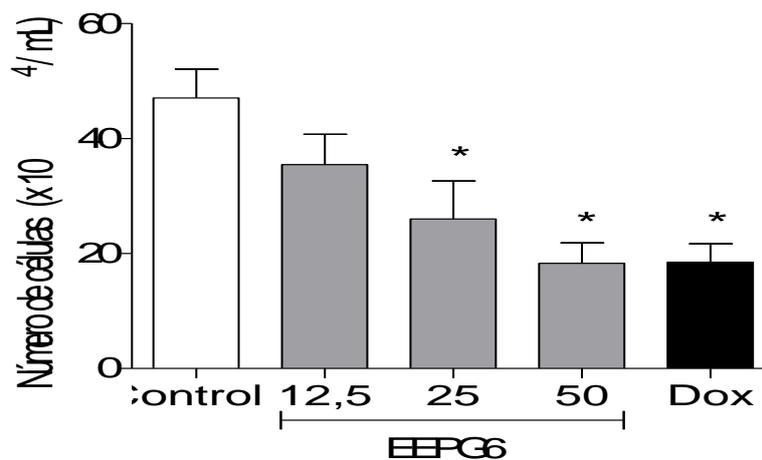


Figura 2. Efeito do EEPG6 sobre a viabilidade de células B16-F10. Células foram tratadas com diferentes concentrações do EEPG6 (12,5; 25 e 50 µg/mL) por 24 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão do corante *trypan blue*. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como droga de referência. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar as substâncias (0,1% DMSO). Os dados apresentam a média ± E.P.M de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

5.2.3 Análise morfológica - Coloração com hematoxilina-eosina

A capacidade do EEPG6 em alterar a morfologia celular após 24 horas de tratamento foi avaliada após a análise microscópica de células B16-F10 coradas com hematoxilina e eosina (Figura 3). Alterações características de apoptose como a condensação de cromatina e a fragmentação nuclear foram mais evidentes quando as células foram tratadas com as maiores concentrações da própolis (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$). Como esperado, o tratamento com a doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) também foi capaz de alterar a morfologia celular de acordo com as condições citadas para o EEPG6, típicas de processo apoptótico.

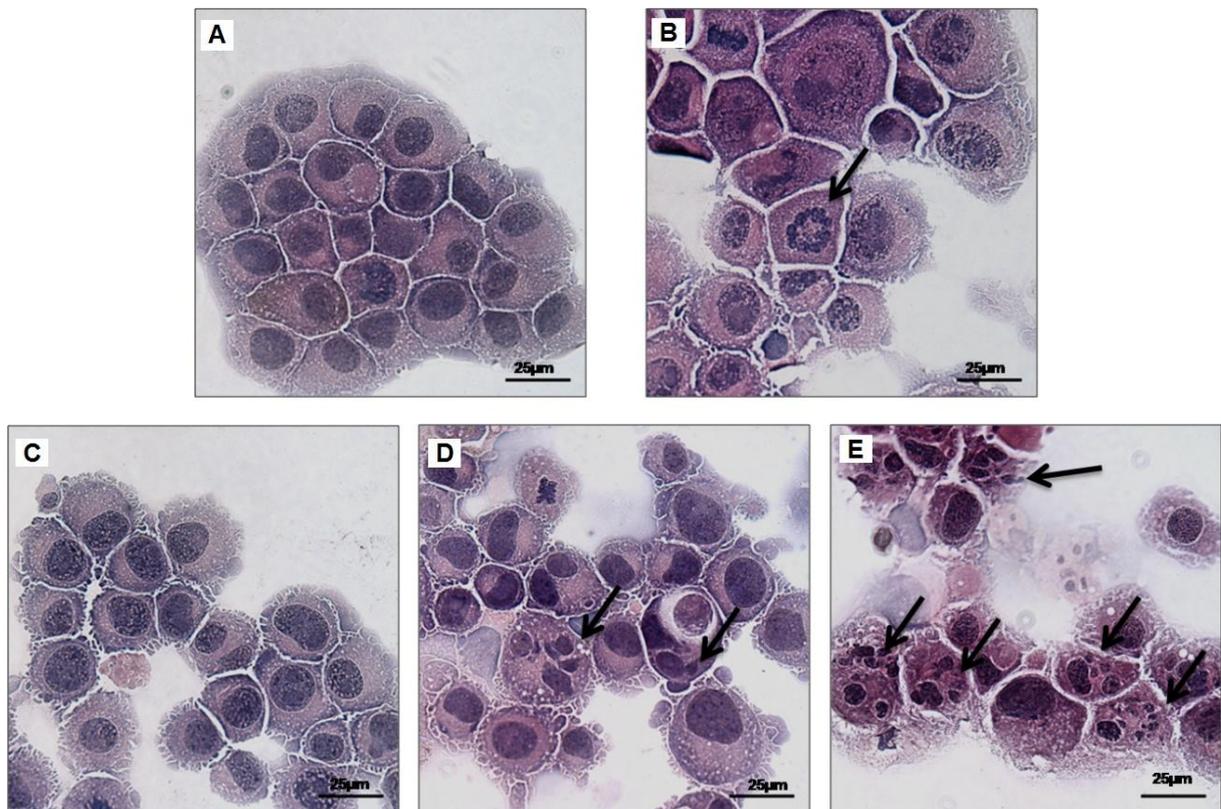


Figura 3. Aspectos morfológicos de células B16-F10 após tratamento com o EEPG6. Células B16-F10 foram tratadas por 24 h com o EEPG6 nas concentrações de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ (C, D e E, respectivamente). A doxorrubicina a 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (B) foi usada como droga de referência. O efeito das substâncias sobre a morfologia celular foi avaliado por comparação ao controle (A) tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias. As setas indicam alterações morfológicas características de processo apoptótico.

5.2.4. Análise morfológica por microscopia de fluorescência – Laranja de Acridina/ Brometo de Etídio (LA/BE)

As alterações morfológicas também foram investigadas através da marcação com laranja de acridina/brometo de etídio por microscopia de fluorescência (Tabela 6). A porcentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas foi calculada. A morfologia normal foi observada em cerca de 75,8% das células B16-F10 não tratadas. Após o tratamento por 24 horas com o EEPG6 nas concentrações de 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, foi observada uma redução da viabilidade celular, assim como um aumento do número de células em apoptose 34,7%, 57,7% e 67,7%, respectivamente quando comparado ao controle não tratado. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) utilizada como droga de referência, também reduziu a viabilidade celular e induziu o aumento de células em apoptose, como esperado.

Tabela 6. Alterações morfológicas em células B16-F10 induzidas pelo EEPG6.

	Viabilidade celular		
	Viável	Apoptose	Apoptose Tardia/ Necrose
Controle	75,8 ± 3,5	10, 0 ± 2,1	14,1 ± 1,5
Doxorrubicina	49,8 ± 1,7 *	39,6 ± 1,6 *	11,3 ± 0,3
EEPG6 12,5 µg/mL	53,4 ± 9,2 *	34,7 ± 9,7 *	11,8 ± 1,4
EEPG6 25 µg/mL	32, 6 ± 5,3 *	57,7 ± 5,6 *	9,8 ± 0,6
EEPG6 50 µg/mL	19,1 ± 3,8 *	67,7 ± 3,2 *	13,4 ± 0,9

Dados apresentados como porcentagens de células viáveis, apoptóticas e apoptóticas tardias/ necróticas ± E.P.M de três experimentos independentes. * $P < 0,01$ quando comparado ao controle negativo por ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

5.2.5 Avaliação do perfil de morte celular – Externalização de fosfatidilserina

A avaliação do perfil de morte celular foi avaliada a partir da externalização da fosfatidilserina (Figura 4), através da ligação de anexina V a fosfolipídios de membrana celular. Os resultados obtidos demonstram maior exposição de fosfatidilserina em células B16-F10 tratadas com as maiores concentrações do EEGP6 (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas, com porcentagens médias de anexina positiva em torno de 20% e 32%, respectivamente, quando comparadas ao grupo não tratado.

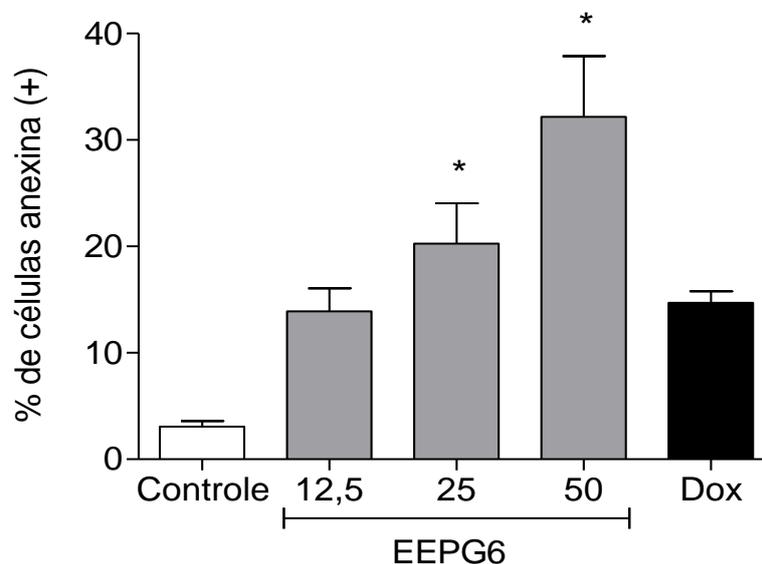


Figura 4. Efeito do EEGP6 sobre externalização de fosfatidilserina da membrana celular em células B16-F10. Células foram tratadas com diferentes concentrações do EEGP6 (12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h e a externalização da fosfatidilserina foi determinado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias. A doxorrubicina foi usada como droga de referência (Dox = 0,3 $\mu\text{g/mL}$). Os valores correspondem à média \pm E.P.M de três experimentos independentes. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por pós-teste de Bonferroni.

5.2.6 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

O potencial transmembrânico mitocondrial foi determinado por retenção do corante rodamina 123, analisado em citômetro de fluxo. A figura 5 representa a despolarização mitocondrial em células B16-F10 tratadas com as concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL testadas do EEPG6 após 24 h de tratamento, quando comparadas ao controle não tratado. Além disso, o tratamento com a maior concentração do EEPG6 (50 µg/mL) induziu uma taxa de despolarização significativa em relação à droga de referência, a doxorubicina.

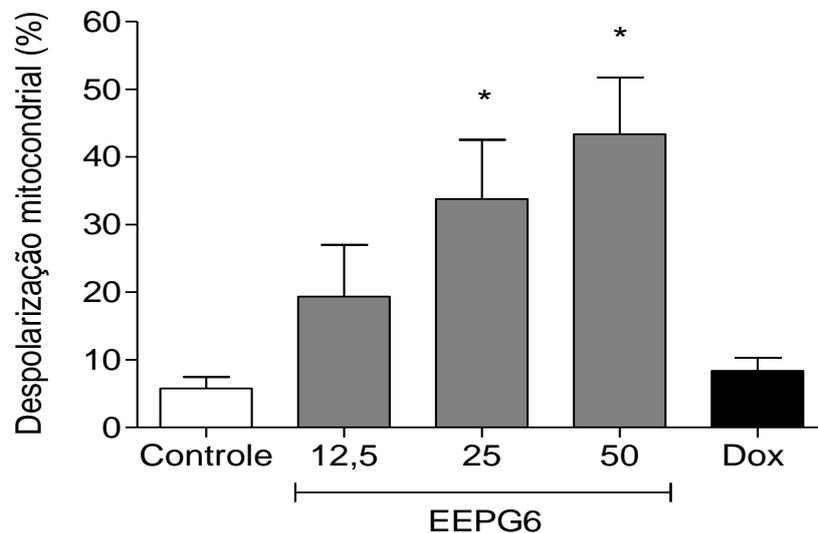


Figura 5. Efeito do EEPG6 sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células B16-F10. Células foram tratadas com diferentes concentrações do EEPG6 (12,5; 25 e 50 µg/mL) por 24 horas e o potencial transmembrânico foi determinado por citometria de fluxo por incorporação da rodamina 123. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias. A doxorubicina foi usada como droga de referência (Dox = 0,3 µg/mL). Os valores correspondem à média ± E.P.M. de dois experimentos independentes, em duplicatas. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por pós-teste de Bonferroni.

5.2.7 Ativação de Caspase-3

A atividade da caspase-3 tem importante papel na indução da apoptose, já que esta é responsável pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e controle do DNA. Assim, a dosagem da caspase-3 permite o estudo de mecanismos apoptóticos (MEHMET, 2002). Como pode ser observado na Figura 6, houve uma ativação significativa da caspase-3 após 24 horas de tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ do EEGG6 e em células tratadas com a doxorrubicina a 0,3 $\mu\text{g/mL}$. Esse dado sugere a participação da caspase-3 na apoptose de células B16-F10 induzida pelo EEGG6.

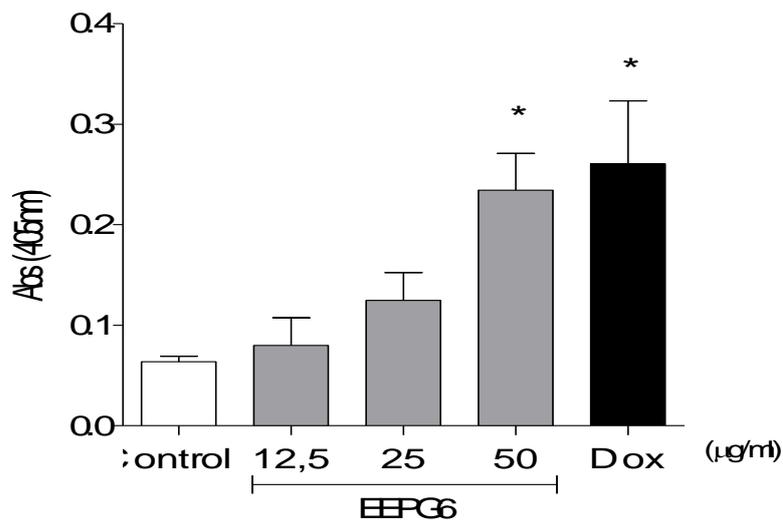


Figura 6. Efeito do extrato etanólico da própolis G6 sobre a ativação da caspase-3 em células do melanoma B16-F10 após 24 horas de incubação. No grupo controle foi utilizado apenas o veículo (DMSO) para diluir o EEGG6. A doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como a droga de referência (Dox). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por comparação múltipla de Tukey.

5.2.8 Análise do ciclo celular

O efeito do EEPG6 sobre a progressão das fases do ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da incorporação de iodeto de propídio. A tabela 7 mostra os resultados encontrados. O EEPG6 induziu parada do ciclo celular na fase G₂/M, nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL (17,64% do controle não tratado contra 29,54% e 36,77% das células tratadas com o EEPG6, nas respectivas concentrações). O aumento de células na fase G₂/M foi acompanhado por uma redução de células na fase G₀/G₁: 60,49% do controle não tratado contra 45,38% e 35,73% de células tratadas com 25 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. A doxorrubicina também induziu tais efeitos, mas, os valores foram significativos apenas quando comparados ao controle não tratado e a menor concentração testada (12,5 µg/mL) do EEPG6.

Tabela 7. Efeito do EEPG6 sobre as fases do ciclo celular em células B16-F10

Substância	Concentração (µg/mL)	% de células em diferentes fases do ciclo celular/ conteúdo de DNA			
		Sub G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Controle	-	4,03 ± 1,03	60,49 ± 1,60	11,34 ± 1,72	17,64 ± 0,28
Dox	0,3	6,83 ± 2,64	33,61 ± 4,81*	9,58 ± 0,67	40,39 ± 2,24*
	12,5	4,67 ± 0,76	51,86 ± 4,00	13,25 ± 1,25	25,17 ± 1,15
EEPG6	25	7,69 ± 0,75	45,38 ± 1,45*	12,05 ± 2,55	29,54 ± 5,08*
	50	11,97 ± 1,08	35,73 ± 1,56*	8,32 ± 0,85	36,77 ± 7,26*

Dados apresentados como porcentagem média ± E.P.M de dois experimentos independentes, realizados em duplicata, com dez mil eventos analisados. * $P < 0,05$.

5.2.9 Avaliação do efeito de ROS sob a atividade do EEPG6

A avaliação da relação de ROS e os efeitos citotóxicos induzidos pelo EEPG6 sobre as células B16-F10 foram realizados por contagem celular através do método de exclusão por marcação com o *trypan blue*. Como é possível observar na figura 7, a viabilidade celular após 24 horas de tratamento com o EEPG6 (12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL) na ausência ou presença do inibidor de ROS (NAC) foi semelhante, assim como a doxorubicina (Dox = 0,3 µg/mL), com redução significativa do número de células quando comparadas ao controle negativo. Este dado sugere que a ação citotóxica do EEPG6 não está relacionada com a ação de espécies reativas de oxigênio.

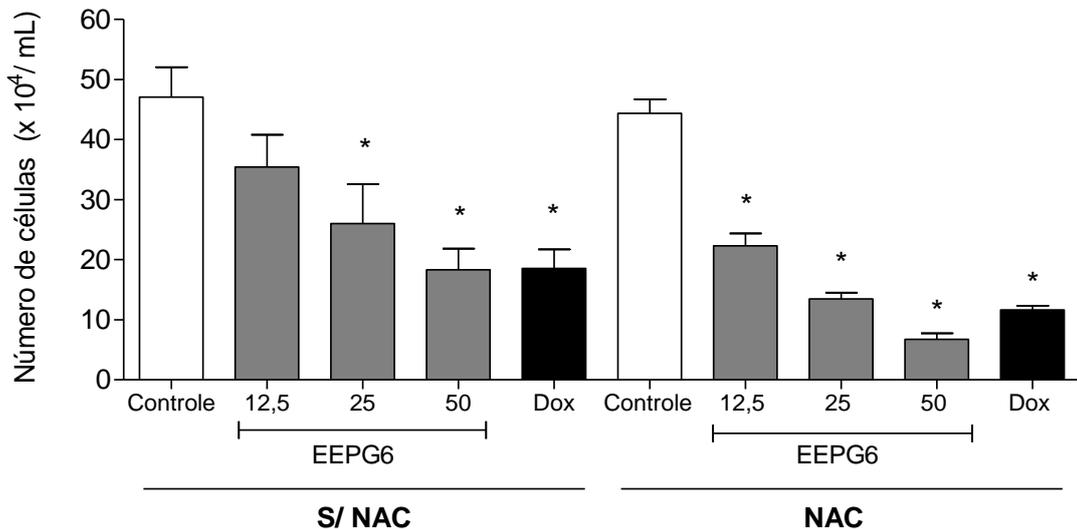


Figura 7. Efeito do EEPG6 sobre a viabilidade de células B16-F10 e sua relação com ROS. Células foram tratadas com diferentes concentrações do EEPG6 (12,5; 25 e 50 µg/mL) por 24 horas, na presença ou ausência do inibidor (NAC = 5 mM) de ROS. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão do corante *trypan blue*. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como droga de referência. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar as substâncias (0,1% DMSO). Os dados representam a média ± E.P.M de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle por ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

5.3. Avaliação da atividade antineoplásica do EEPG6 *in vivo*

O efeito do tratamento oral do EEPG6 em camundongos C57Bl/6 portadores de melanoma subcutâneo induzido por administração de células B16-F10 no dorso dos animais está representado na figura 8. No 14º dia após o transplante do tumor, a massa média dos tumores excisados dos animais controle foi de $0,6 \pm 0,1$ g. As massas neoplásicas retiradas dos animais tratados com o EEPG6 (200 mg/kg) apresentou peso médio de $0,1 \pm 0,05$ g (cerca de 81,72% de redução, com $P < 0,002$). O peso médio dos tumores retirados dos animais tratados com a droga de referência (ciclofosfamida na dose de 20 mg/kg), foi de e $0,2 \pm 0,08$ g, com $P < 0,05$. Embora a dose de 100 mg/kg do EEPG6 tenha induzido uma aparente redução (cerca de 58%) da massa neoplásica média, esse valor não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle negativo.

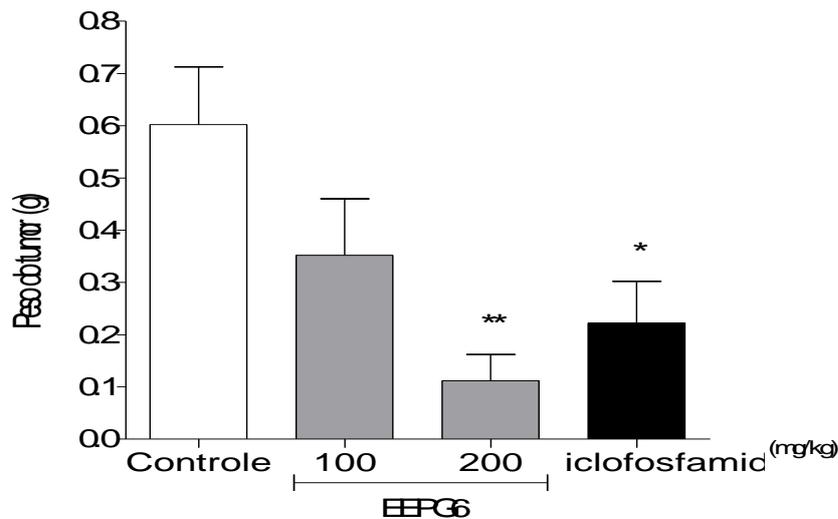


Figura 8 – Efeito do tratamento oral com o EEPG6 sobre o desenvolvimento de melanoma subcutâneo. Camundongos foram tratados com EEPG6 (100 e 200 mg/kg) por via oral durante 20 dias. O controle negativo foi tratado com o veículo usado para diluir o EEPG6 (propilenoglicol). A ciclofosfamida (20 mg/kg) foi utilizada como droga de referência. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de dez animais. ** $P < 0,002$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por pós-teste de Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos trabalhos foram publicados abordando o potencial citotóxico e antineoplásico de própolis originadas de diferentes regiões e de seus componentes químicos (ORSOLIC et al., 2003; SEDA VATANSEVER et al., 2010; BORGES et al., 2011; VALENÇA et al., 2013). Este trabalho apresenta os mecanismos envolvidos na atividade citotóxica *in vitro* do EEPG6 em células B16-F10 de melanoma murino, além de demonstrar a sua atividade antineoplásica em camundongos portadores de melanoma subcutâneo.

No intuito de determinar a atividade antiproliferativa e a citotoxicidade seletiva, o EEPG6 foi testado em cinco linhagens tumorais, em células normais de baço de camundongo e em células do sangue periférico humano. De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio preliminar, os valores de CI_{50} encontrados para o EEPG6 em todas as linhagens tumorais foram menores que 30 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerado um valor favorável para o desenvolvimento de uma droga anticâncer a partir de extratos (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990). Resultados similares foram observados num estudo realizado por ISHIHARA et al. (2009). Estes autores evidenciaram que os extratos etanólicos de própolis brasileira e croata são capazes de inibir a proliferação de quatro linhagens de carcinoma de cólon humano, apresentando valores de CI_{50} variando entre 4 $\mu\text{g/mL}$ a 41 $\mu\text{g/mL}$ após 72 h de tratamento. Em nossos ensaios, o EEPG6 não foi seletivo para células neoplásicas, de todo modo, é possível considerar que os quimioterápicos convencionais empregados atualmente no tratamento do câncer apresentam elevada toxicidade por serem pouco seletivos (CHEN et al., 2013).

Através dos dados obtidos pelo ensaio de MTT, foi observado que EEPG6 foi capaz de inibir a proliferação de células B16-F10, e esse resultado foi confirmado pelo teste de exclusão do corante *trypan blue*. Utilizando metodologia semelhante, BÚFALO et al. (2007), demonstrou o efeito inibitório induzido pelo extrato etanólico da própolis verde brasileira (100 $\mu\text{g/mL}$) em células de carcinoma laríngeo HEP-2, após 24 horas de tratamento. Em outro trabalho, THIRUGNANASAMPANDAN et al. (2012), observou o efeito citotóxico do extrato hidroalcoólico de um tipo de própolis indiana sobre células A549 (câncer de pulmão) e células MCF-7 (câncer de mama). O extrato foi capaz de aumentar a morte celular em quase 50% após 48 horas de tratamento de maneira dependente do tempo e das concentrações (2 – 20 $\mu\text{g/mL}$).

O desenvolvimento de fármacos com alto potencial apoptótico é de grande interesse para o tratamento de melanoma resistente aos atuais quimioterápicos disponíveis (BENTKE et al., 2013). A apoptose é um mecanismo de morte molecularmente regulado que desempenha papel fundamental no desenvolvimento tecidual, na homeostase, na progressão e controle do câncer (CHIPUK & GREEN, 2005). Esse mecanismo de supressão celular induz alterações morfológicas típicas, como a condensação citoplasmática e nuclear, a formação de vesículas na membrana plasmática (*blebbings*), a clivagem do DNA por endonucleases específicas e a formação de corpos apoptóticos (KERR et al., 1972; COTTER et al., 1990; KATAOKA & TSURUO, 1996).

A análise dos aspectos morfológicos das células B16-F10 após tratamento com o EEPG6 demonstrou alterações celulares características de apoptose como fragmentação nuclear, condensação de cromatina e formação de bolhas na superfície da membrana plasmática. Segundo Chen et al. (2004), a propolína C, um componente isolado de própolis taiwanesa, foi capaz de induzir fragmentação nuclear e condensação de cromatina em células A2058 de melanoma humano após 24 horas de tratamento. Outra mudança morfológica característica também associada à morte celular por apoptose é a externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática e este evento pode ser identificado por ligação de anexina V (WANG et al., 2012; LEE et al., 2013). Em nossos ensaios, um aumento de marcação para anexina V em células B16-F10 após o tratamento por 24 horas com o EEPG6 foi observado, sugerindo o efeito citotóxico associado a apoptose.

Para melhor caracterizar a via apoptótica envolvida no processo de morte induzida pelo EEPG6, foi avaliado o efeito do referido extrato sobre o potencial transmembrânico mitocondrial. Os resultados obtidos a partir dessa análise demonstram que o EEPG6 alterou a integridade mitocondrial de células B16-F10 tratadas por 24 horas, corroborando com os dados encontrados nos experimentos de proliferação e morfologia celular, sugerindo ainda, a participação da via intrínseca mitocondrial na morte celular de B16-F10 induzida pelo EEPG6.

A morte por apoptose parece ser um mecanismo de ação comum associado à própolis. Um estudo realizado por FRANCHI JR et al. (2012), mostrou que o extrato etanólico da própolis vermelha (100 µg/mL) encontrada na região nordeste brasileira

foi capaz de induzir um aumento significativo de células K562 (leucemia mielóide crônica) marcadas com anexina V (células apoptóticas) após 12 horas de tratamento. EOM et al. (2010), identificou o efeito antiproliferativo da própolis em células leucêmicas humanas HL-60. Neste trabalho, a própolis induziu a ativação de caspase-3 e liberação de citocromo C da mitocôndria, evidenciando a ação inibitória devido à apoptose induzida por via intrínseca. De acordo com os nossos dados, o EEPG6 também foi capaz de promover a ativação de caspase-3, quando as células B16-F10 foram tratadas por 24 horas com a maior concentração da própolis. A ativação de caspase-3 está correlacionada a alterações morfológicas (condensação de cromatina e fragmentação de DNA) e eventos bioquímicos característicos de morte celular por apoptose (PORTER & JÄNICKE, 1999).

Muitos fármacos anticâncer têm seu mecanismo de ação baseados na interação com o DNA, agindo em células que se encontram no ciclo celular. Fármacos ciclo específicos derivados de produtos naturais representam importantes agentes antineoplásicos utilizados na clínica atualmente como, por exemplo, os alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina), o taxol (Placlitaxel®) e as podofiltoxinas (ALMEIDA et al., 2005). O EEPG6 induziu parada no ciclo celular de células B16-F10 na fase G₂/M. Na fase G₂/M existe um sistema de checagem fundamental que impede a entrada da célula na fase M do ciclo celular, caso o genoma esteja danificado (DIAZ-CANO, 2008).

Fármacos que agem sobre o ciclo celular, induzindo parada na fase G₂/M, levam a célula à morte por apoptose, e geralmente atuam sobre a topoisomerase II que é um alvo importante no tratamento do câncer (SHIN et al., 2010; MIZUSHINA et al., 2010; KOLB et al., 2012). A propolina A, isolada de própolis taiwanesa, aumentou a fragmentação do DNA em células de melanoma humano após 24 horas de tratamento, e o aumento de células sub-G1 foi sugestivo de apoptose. Além disso, o mesmo composto inibiu a proliferação de outras linhagens celulares cancerígenas através da morte por apoptose (CHEN et al., 2003).

Para investigar uma possível correlação entre os efeitos citotóxicos do EEPG6 e a geração de ROS, células B16-F10 foram previamente tratadas com um agente antioxidante, o NAC. Foi observado que o efeito antiproliferativo do EEPG6 se manteve mesmo após o tratamento com o antioxidante, sugerindo que a ação citotóxica do EEPG6 independe da presença de ROS. Em oposição a estes dados, diversos trabalhos têm demonstrado que metabolismo mitocondrial está associado à

geração de espécies do oxigênio (CHENG & RISTOW, 2013) e o estresse oxidativo pode levar a ativação da via intrínseca da apoptose (MARINHO-FILHO et al., 2010) através da abertura de poros na membrana mitocondrial induzida por ROS (SCULACHEV, 1998).

NAKAMURA et al. (2012) relatou a capacidade do extrato etanólico de própolis brasileira em reduzir o dano oxidativo hepático, inibindo a peroxidação lipídica e a atividade de mieloperoxidase em ratos submetidos a estresse por imersão em água. FROZZA et al. (2013) demonstrou a atividade anticâncer e antioxidante da própolis vermelha brasileira em células de carcinoma laríngeo Hep-2 e adenocarcinoma de cólon uterino HeLa. Peixes expostos à elevadas doses de um inseticida que tem sua toxicidade associada ao estresse oxidativo foram tratados com um tipo de própolis do álamo da Turquia e, após o tratamento, os níveis teciduais de moléculas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e a catalase aumentaram (YONAR et al., 2012).

A administração de células B16-F10 no dorso de camundongos C57BL/6 foi realizada no intuito de investigar o efeito antineoplásico do EEPG6 em ensaio *in vivo*. Células da linhagem B16-F10 apresentam um fenótipo extremamente agressivo e com alto potencial metastático quando inoculadas por via intravenosa ou subcutânea (FIDLER, 1975). O EEPG6 foi capaz de reduzir de maneira dose-dependente a progressão do tumor.

Um extrato de própolis da Nova Zelândia, enriquecido com CAPE (ácido caféico éster fenetil) foi capaz de inibir o crescimento de tumores humanos de neurofibromatose em modelos xenográficos murinos (DEMESTRE et al., 2009). A própolis do álamo, por exemplo, e alguns de seus componentes polifenólicos isolados (ácidos caféicos e quercetina), reduziram o número de nódulos de carcinoma mamário em camundongos CBA e, quando o efeito antimetastático foi avaliado, estes constituintes apresentaram melhor resultado (ORSOLIC et al., 2003, 2004). Além disso, ORSOLIC et al. (2005) demonstrou que o tratamento combinado de componentes solúveis extraídos de própolis croata e brasileira com o quimioterápico epirrubicina apresenta melhor perfil antimetastático em modelo experimental de metástase pulmonar induzido por carcinoma mamário. BENKOVIC et al. (2007) demonstrou o efeito sinérgico do tratamento com o quimioterápico irinotecano e componentes solúveis de própolis croata e brasileira sobre o

crescimento de tumor ascítico de Erlich, bem como sobre a sobrevivência dos animais tratados.

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que a própolis G6 baiana, um produto de origem natural, representa um agente antineoplásico com potencial promissor. Foi evidenciada a capacidade antiproliferativa e citotóxica do EEG6 associada à morte celular por uma via apoptótica. Além disso, confirmamos que o EEG6 tem ação antineoplásica sobre o desenvolvimento de melanoma subcutâneo murino.

Entretanto, estudos adicionais sobre as propriedades farmacológicas, mecanismo de ação, o isolamento e caracterização de componente(s) bioativo(s), e, sobretudo, a avaliação da atividade antimetastática da própolis G6 necessitam ser realizados.

7 CONCLUSÃO

- O extrato etanólico da própolis G6 baiana apresenta atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas;
- O EEPG6 apresenta mecanismo de ação citotóxico em células B16-F10 relacionado possivelmente a morte por apoptose com participação da via mitocondrial, supostamente sem a dependência de ROS e com indução de parada do ciclo celular em G₂/M;
- O EEPG6 reduziu o crescimento de tumores em camundongos portadores de melanoma murino B16-F10.

REFERÊNCIAS

- ALGAZI, A.P; SOON, C.W; DAUD, A.I. Treatment of Cutaneous Melanoma: current approaches and future prospects. **Cancer Management Research**, v. 17, p. 197-211, 2010.
- ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-119, 2005.
- AMATO NETO, V. et al. **Quimioterápicos na Prática Médica**. São Paulo: Editora Gremed Ltda., 1975. p. 149-158.
- AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco crescente de melanoma de pele no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 26, p. 290–294, 1992.
- BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010, p. 1–8, 2010.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.
- BANKOVA, V. et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-336, 1998.
- BANSKOTA, A.H; TEZUKA, Y; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.
- BEDIKIAN, A.Y. et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 4738-4745, 2006.

BENKOVIC, V. et al. Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Erlich ascites tumor mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 292–297, 2007.

BENTKE, A. et al. Tanespimycin and tipifarnib exhibit synergism in inducing apoptosis in melanoma cell lines from later stages of tumor progression. **Cancer Investigation**, v. 31, p. 545– 559, 2013.

BORGES, K.S. et al. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 310-314, 2011.

BÚFALO, M.C; CANDEIAS, J.M.G; SFORCIN, J.M. In vitro cytotoxic effect of brazilian Green propolis on human layngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 6, p. 483-487, 2007.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347–363, 1998.

CABRAL, I.S.R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química.Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CASTALDO, S; CAPASSO, F; Propolis, na old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. 1-6, 2002.

CASTRO, M.L. et al. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, p. 9-25, 2009.

CHATURVEDI, P.K; BHUI, K; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1-13, 2008.

CHEN, K.C; SCHMUCK, K; TIETZE, L.F; ROFFLER, S.R. Selective Cancer Therapy by Extracellular Activation of a Highly Potent Glycosidic Duocarmycin Analogue.

Molecular Pharmaceutics, 2013.

CHEN, W. et al. Cancer burden in China: a Bayesian approach. **BMC Cancer**, v. 13, p. 458, 2013.

CHEN, C.N; WU, C.L; SHY, H.S; LIN, J.K. Cytotoxic prenylflavanones of taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 503–506, 2003.

CHEN, C.N; WU, C.L; LIN, J.K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 53–66, 2004.

CHENG, Z; RISTOW, M. Mitochondria and Metabolic Homeostasis. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2013.

CHIN, J.E. et al. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 3808–3820, 1989.

CHIPUK, J.E; GREEN, D.R. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? **Nature Reviews/ Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 268–275, 2005.

CIGUT, T. et al. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11449-11455, 2011.

CLARK, J. R. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research**, v. 29, p. 705– 26, 1969.

COTTER, T.G. et al. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. **Anticancer Research**, v. 10, n. 5A, p. 1153–1159, 1990.

CRAGG, G.M; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA) – General Subjects**. v. 1830, n. 6, p.

3670-3695, 2013.

CUI, Q; YU, J; WU, J; TASHIRO, S; ONODERA, S; MINAMI, M; IKEJIMA, T. P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, p. 1057-1066, 2007.

CURT, G.A. Cancer Drug Development: New Targets for Cancer Treatment. **The Oncologist**, v. 1, p. 2 - 3, 1996.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DEMESTRE, M. et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 226–230, 2009.

DESAI, A.G. et al. Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. **Current Drug Metabolism**. v. 9, p. 581-591, 2008.

DIAS, L.G; PEREIRA, A.P; ESTEVINHO, L.M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4246-4253, 2012.

DIAS, S.R. et al. The European Medicines Agency review of vemurafenib (Zelboraf[®]) for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma: Summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. **European Journal of Cancer**, 2013.

DIAZ-CANO, S.J. General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. **Hystopathology**, v, 53, p. 1–19, 2008.

DIZDAREVIC, S; PETERS, A.M. Imaging of multidrug resistance in cancer. **Cancer Imaging**, v. 11, p. 1–8, 2011.

DUARTE, S. et al. Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 527-531, 2003.

DUTT, R; MADAN, A.K. Classification models for anticancer activity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 2013.

EL-KHAWAGA, O.A; SALEM, T.A; ELSHAL, M.F. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. **Clinica Chimica Acta**, v. 338, p. 11-16, 2003.

EOM, H.S. et al. Propolis inhibits the proliferation of human leukaemia HL-60 cells by inducing apoptosis through the mitochondrial pathway. **Natural Product Research**, v. 24, p. 375–386, 2010.

FERRARI JUNIOR, N.M et al. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. **Med. J.** vol.126, n.1, p. 41-47, 2008.

FERREIRA, P.M.P. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011.

FIDLER, I.J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer Research**, v. 35, p. 218–224, 1975.

FIGUEIREDO, L.C, et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, p. 179-183, 2003.

FRANCHI JUNIOR, G.C. et al. Comparison of Effects of the Ethanolic of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

FROZZA, C.O.S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.

GATTI, L.; ZUNINO, F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. **Methods in Molecular Medicine**, v. 111, p. 127–148, 2005.

GENE. BCL2 B-cell CLL/lymphoma 2 [*Homo sapiens*]. Gene ID: 596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

GOLDMAN & BENNETT et al. **Cecil – Tratado de Medicina Interna**, 21^a edição, Volumes 1 e 2, Editora Guanabara Koogan, 2001.

GOMPEL, A. et al. Oncology in medilife and beyond. **Climateric**, v. 16, p. 522–535, 2013.

GUDDATI, A.K. A novel strategy of cancer therapy by enucleation. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 10, p. 113-117, 2012.

GUERRY IV, D. et al. Lessons of tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, p. 342–345, 1993.

GUTSCHNER, T; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer – A long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, p. 703–719, 2012.

HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HARTMAN, M.L; CZYZ, M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. **Cancer Letters**, v. 331, p. 24-34, 2013.

HELFAND, M. et al. Screening for Skin Cancer. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 20, p. 47-58, 2001.

HOANG, M.T; EICHENFIELD, L.F. The rising incidence of melanoma in children and adolescents. **Dermatology Nursing**, v. 12, p. 188-189, 192-3, 2000.

HOSKIN, D.W; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 357–375, 2008.

HUSSAIN, S.A; SULLIVAN, R. Cancer control in Bangladesh. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, 2013.

HUSSEIN, M.R; HAEMEL, A.K; WOOD, G.S. Apoptosis and Melanoma: molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 199, p. 275-288, 2003.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Normas e Recomendações do INCA – Prevenção do Câncer de Pele. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 49, p. 203, 2003.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma>. Acesso em: 08 dez. 2012.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/tratamento>. Acesso em: 08 dez. 2012.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/>. Acesso em: 08 dez. 2012.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 08 dez. 2012.

ISHIHARA, M. et al. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology Reports**, v.

22, p. 349–354, 2009.

JANJETOVIC, K. et al. In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 373-382, 2011.

JEMAL, A. et al. D. Cancer Statistics, 2010. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, p. 277–300, 2010.

JORDAN, M.A; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 253-265, 2004.

KARIKAS, G.A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **Journal of B.U.ON: official journal of the Balkan Union of Oncology**. v. 15 (4), p. 627–638, 2010.

KATAOKA, S; TSURUO, T. Physician Education: Apoptosis. **The Oncologist**, v. 1, n. 6, p. 399–401, 1996.

KERR, J.F. WYLLIE, A.H; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.

KOCH, M. Main anticancer substances of vegetable origin. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales**, v. 186, n. 5, p. 441-457, 1992.

KOLB, R.H. et al. ERK1/2 signaling plays an important role in topoisomerase II poison-induced G2/M checkpoint activation. **Plos One**, v. 7, 2012.

KONG, Y; KUMAR, S.M; XU, X. Molecular Pathogenesis of Sporadic Melanoma and Melanoma-Initiating Cells. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, p. 1740-1749, 2010.

KORSMEYER, S.J. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. **Cancer Surveys**, v. 15, p. 105-118, 1992.

KUMAZAWA, S; HAMASSAKA, T; NAKAYAMA, T. antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

KUSHNIR, I; MERIMSKY, O. The Evolution in Melanoma Treatment as a reflection of precision-oriented medicine. **Oncology letters**, v. 5, p. 424-426, 2013.

LE, K; BLOMAIN, E; RODECK, U; APLIN, A.E. Selective RAF inhibitor impairs ERK1/2 phosphorylation and growth in mutant NRAS, vemurafenib-resistant melanoma cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 2013.

LEE, S.H. et al. Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, p. 64–76, 2013.

LIN, W.L. et al. Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75(NTR) in C6 glioma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188 (3), p. 607-615, 2010.

LOPEZ, A.D. Competing causes of death. A review of recent trends in **mortality** in industrialized countries with special reference to **cancer**. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 609, p. 58–74, 1990.

LUO, G. et al. HBV infection increases the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. **Cancer Causes & Control**, v. 24, p. 529-537, 2013.

MACHADO, J.L. et al. Brazilian Green propolis: anti-inflammatory property by na immunomodulatory activity. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, 2012.

MANDALÀ, M; VOIT, C. Targeting BRAF in melanoma: Biological and clinical challenges. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, 2013.

MARKIEWICZ-ZUKOWSKA, R. et al. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 50, 2013.

MARINHO-FILHO, J.D. et al. Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, p. 439–448, 2010.

MEHMET, H. Apoptosis: Caspase finds a new place to hide. **Nature**, v.403, p.29-30, 2000.

MENEZES, H. Própolis: Uma Revisão dos Recentes Estudos de suas Propriedades Farmacológicas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, p. 405-411, 2005.

MENEZES, I.A. et al. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice. **Fitoterapia**, v. 78, p. 192–195, 2007.

MESSERLI, S.M. et al. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, p. 239–246, 1997.

MIZUSHINA, Y. et al. Inhibitory effects of docosyl p-coumarate on DNA topoisomerase activity and human cancer cell growth. **International Journal of Oncology**, v. 37, p. 993–1000, 2010.

MORENO NOGUEIRA, J.A; VALERO ARBIZU, M; PÉREZ TEMPRANO, R. Adjuvant Treatment of Melanoma. **ISRN Dermatology**, 2013.

NAJMAN, H; GADELHA, M.I.P. Temozolamida. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, p. 439-445, 2002.

NAKAMURA, T. et al. Protective Effect of Brazilian Propolis Against Hepatic Oxidative Damage in Rats with Water-immersion Restraint Stress. **Phytotherapy Research**, v.

26, p. 1482-1489, 2012.

National Cancer Institute – NCI. What You Need to Know About Melanoma and Others Skin Cancers, NCI, 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/skin>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

National Cancer Institute – NCI. A Snapshot of Melanoma.NCI, 2010. Disponível em:< <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/melanoma-instantaneas.pdf>> Acesso em: 12 dez. 2012.

National Cancer Institute – NCI. Dictionary of Cancer Terms.NCI, 2012. Disponível em:<<http://www.cancer.gov/common/popUps/popDefinition.aspx?id=CDR0000045135&version=Patient&language=English>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

NOMURA, M. et al. Suppression of cell transformations and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester.**Molecular Carcinogenesis**, v. 31, p. 83-90, 2001.

NOOTER, K; HERWEIJER, H. Multidrug resistance (*mdr*) genes in human cancer. **Br. J. Cancer**, v. 63, p. 663– 69, 1991.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 06 fev. 2013.

ORSOLIC, N. et al. I. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible mode of antitumor action. **Nutrition and Cancer**, v. 47, p. 156–163, 2003.

ORSOLIC, N et al. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 307–315, 2004.

ORSOLIC, N; BASIC, I. Antitumor, hematoestimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 561–570, 2005.

PAILOOR, J; MUN, K.S; LEOW, M. Cutaneous malignant melanoma: clinical and histopathological review of cases in Malaysian tertiary referral center. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 34, p. 97-101, 2012.

PAPOLO, A. et al. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. **Natural Product Communication**, v. 4, p. 1711-1716, 2009.

PARDO-ABREU, G.L. et al. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: ensuing energetic and oxidative stress implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, p. 282-289, 2011.

PARK, Y. K; ALENCAR, S.M; AGUIAR, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502–2506, 2002.

PRATHEESHKUMAR, P. et al. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1159-1184, 2012.

PEREGRINO, A.A.F. et al. **Síntese das Avaliações Tecnológicas sobre PET realizadas por Agências Internacionais de ATS na área de Oncologia**. 2004. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/relat%201%20pet%20%20sintese%20das%20agencias%20internacionais%20de%20ats.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2012.

PEREIRA, A.S; SEIXAS, F.R.M.S; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas futuras perspectivas. **Química Nova**, v. 25, 2002.

PLÖTZ, M. et al. The BH3-only protein BimL overrides Bcl-2-mediated apoptosis resistance in melanoma cells. **Cancer Letters**, 2013.

PORTER, A.G; JÄNICKE, R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, p. 99–104, 1999.

PRATSINIS, H.. et al. Antiproliferative activity of Greek propolis. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n. 2, p. 286-290, 2010.

QUINTERO-MORA, M.L. et al. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 22-26, 2008.

RABI, T; GUPTA, S. Dietary terpenóides and prostate cancer chemoprevention. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 3457-3469, 2008.

RAGNARSSON-OLDING, B. K. Primary Malignant Melanoma of the Vulva: An aggressive Tumor for Modeling the Genesis of Non-UV Light-associated Melanomas. **Acta Oncologica**, 2004, 43, p. 421-435.

RALPH, S. J.; et al. The causes of cancer revisited: “Mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation – Why mitochondria are targets for cancer therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 145–170, 2010.

RAO, C.V; KURKJIAN, C.D; YAMADA, H.Y. Mitosis-targeting natural products for cancer prevention and therapy. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 1820-1830, 2012.

RAVNAN, M.C; MATALKA, M.S. Vemurafenib in Patients With *BRAF V600E* Mutation–Positive Advanced Melanoma. **Clinical Therapeutics**, v. 34, p. 1474 - 1486, 2012.

ROSAS-ROMERO, A. et al. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lourteigia ballotaefolia*. **Planta Médica**, v. 68, n. 9, p. 843-845, 2002.

SANTOS, M.R. et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 186-191, 2007.

SAWICKA, D. et al. The anticancer activity of propolis. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 50, n. 1, p. 25-37, 2012.

SEDA VATANSEVER, H. et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. **Acta Histochemica**, v. 112, p. 546–556, 2010.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1–14, 2007.

SFORCIN, J.M; ORSI, R.O; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.

SFORCIN, J. M; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253 -260, 2011.

SIMÕES-AMBRÓSIO, L. M. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1102-1108, 2010.

SHIMIZU, T. et al. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and efficacy against influenza infection in mice. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 19, n. 1, p. 7-13, 2008.

SHIN, S.Y. et al. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell arrest and apoptosis in HeLa cells. **Cancer Letters**, v. 287, p. 231–239, 2010.

SILVA, B.V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**. v. 32, 2009.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p.1102-1108, 2010.

SKULACHEV, V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidante cascades. **FEBS**

Letters, v. 423, p. 275–280, 1998.

SPATZ, A; BATIST, G; EGGERMONT, A.M.M. The biology behind prognostic factors of cutaneous melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 22, p. 163–168, 2010.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Assays related to cancer drug discovery** London: Academic Press, 1990. p. 71-133.

SUN, L.P. et al. Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11748-11758, 2012.

SUTTON, V.R. et al. **Cell Death and Disease**, v. 3, p. e344, 2012.

TEERASRIPREECHA, D. et al. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and cardol enriched from Thai *Apis Mellifera* propolis. **BMC complementary and alternative medicine**. v. 12, p. 27, 2012.

THIRUGNANASAMPANDAN, R; RAVEENDRAN, S.B; JAYAKUMAR, R. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 651–654, 2012.

THOPPIL, R.J; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 3, p. 228-249, 2011.

TOVO, L. F. R. et al. Melanoma cutâneo primário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 51, p. 1 – 10, 2005.

VADODKAR, A. S; SUMAN, S; LAKSHMANASWAMY, R; DAMODARAN, C. Chemoprevention of breast cancer by dietary compounds. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1185-1202, 2012.

VALDESPINO-GÓMEZ, V.M; VALDESPINO-CASTILLO, V.E. Non-classical cellular and molecular deficits in cancer development. **Gac. Med. Mex.**, v, 146, p. 185–198, 2010.

VALENÇA, I. et al. Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 184–191, 2013.

WANG, B. et al. Synthesis of novel diosgenyl saponina analogues and apoptosis-inducing activity on A549 human lung adenocarcinoma. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 8822–8834, 2012.

WANG, D; WISE, M.L; LI, F; DEY, M; Phytochemicals attenuating aberrant activation of β -catenin in cancer cells. **Plos One**, v. 7, 2012.

YONAR, E. et al. Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2703-2708, 2012.

ZHANG, J.Y. et al Quercetin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway in KB and KBv200 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.

ZHANG, X.D. et al. Human melanoma cells selected for resistance to apoptosis by prolonged exposure to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand are more vulnerable to necrotic cell death induced by cisplatin. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 1355-1364, 2006.