

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO QUIMIOPREVENTIVO DE VARIEDADES DE
PRÓPOLIS BRASILEIRA SOBRE A CARCINOGENESE
ORAL EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA**

DANIELLE RODRIGUES RIBEIRO CAVALCANTE

ARACAJU

Fevereiro – 2011

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO QUIMIOPREVENTIVO DE VARIEDADES DE
PRÓPOLIS BRASILEIRA SOBRE A CARCINOGENESE
ORAL EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA.**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

DANIELLE RODRIGUES RIBEIRO CAVALCANTE

Orientador (es)

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, D.Sc.

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.

ARACAJU

Fevereiro - 2011

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

C376 Cavalcante, Danielle Rodrigues Ribeiro.
Efeito quimiopreventivo de variedades de própolis brasileira sobre a carcinogênese oral experimentalmente induzida. / Danielle Rodrigues Ribeiro Cavalcante. Orientação [de] Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior e Juliana Cordeiro Cardoso. Aracaju, 2011.
84 f. il.:

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente – Universidade Tiradentes (UNIT)).

1. DMBA. 2. Própolis. 3. Câncer oral. I. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti. (Orient.). II. Cardoso, Juliana Cordeiro (Orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título

CDU: 616.006.6

**EFEITO QUIMIOPREVENTIVO DE VARIEDADES DE PRÓPOLIS BRASILEIRASOBRE A
CARCINOGENESE ORAL EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA**

DANIELLE RODRIGUES RIBEIRO CAVALCANTE

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Orientadora

Margarete Gomes Zanardo, D. Sc.
Examinadora

Márcia Cristina da Costa Miguel, D. Sc.
Examinadora

Luciana Valente Borges, D. Sc
1º Suplente

Sônia Oliveira Lima
2º Suplente

*“Já perdoei erros quase imperdoáveis, tentei substituir pessoas insubstituíveis e
esquecer pessoas inesquecíveis.
Já fiz coisas por impulso, já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me
decepcionar, mas também decepcionei alguém.
Já abracei pra proteger, já dei risada quando não podia, fiz amigos eternos, amei e
fui amado, mas também já fui rejeitado, fui amado e não amei.
Já gritei e pulei de tanta felicidade, já vivi de amor e fiz juras eternas, fiquei triste
muitas vezes!
Já chorei ouvindo música e vendo fotos, já liguei só pra escutar uma voz, me
apaixonei por um sorriso.
Já pensei que fosse morrer de tanta saudade e tive medo de perder alguém especial
(e acabei perdendo)!
Mas vivi!
E ainda vivo!
Não passo pela vida.
Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito boa para ser insignificante”*

Charles Chaplin

... Dedico esta dissertação

A **Deus**, por ter me concedido os dois maiores dons divinos, a vida e a família, e por ser o meu alicerce na fé e no amor durante todos os momentos da minha vida. Sem Ti Senhor, essa vitória seria impossível.

Aos meus pais, **Geraldo José** e **Norma** (*sempre presente*) pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

A minha irmã **Vívian** pelo apoio e carinho.

Aos meus tios (as), primos (as) por tudo o que representam na minha vida e pelo sacrifício, compreensão, carinho e incentivo constantes, que tanto contribuíram para que fosse possível a concretização deste ideal.

Agradecimento Especial...

Ao **Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior** (*Ricardinho*), pela oportunidade, confiança dispensadas a mim, pela competência com que orientou esta dissertação e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com tranquilidade, coerência e confiança. Obrigada por transmitir seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida, por acreditar em mim, por ter me guiado para além da teoria e das técnicas... Obrigada por sempre me ouvir e por me acolher nos momentos em que mais necessitei.

Pelo acesso que me facilitou a uma pesquisa mais alargada e pela sua crítica sempre tão enriquecedora.

Seus ensinamentos pessoais e profissionais, fundamentados no rigor científico e compromisso com a ciência levarei como lição. Sou grata pelo incentivo constante e fundamental na realização deste trabalho.

Neste agradecimento tento expressar um pouco do carinho, admiração e respeito que tenho por você. Serei eternamente grata por tudo que até hoje fez por mim, começando pela imensa contribuição já na minha iniciação científica.

Expresso aqui meus agradecimentos e profundo respeito, que sempre serão mínimos diante do muito que me foi oferecido.

À **Profª Dra. Juliana Cordeiro Cardoso** pelo carinho, atenção e por estar disponível para me atender nos momentos das minhas dúvidas e angústias. O meu sincero agradecimento por executar com competência a minha orientação e, acima de tudo, pela amizade incontestada, da qual me orgulho de ser merecedora.

AGRADECIMENTOS

Aos **meus pais** pela confiança e apoio mesmo distantes, sempre presente ao longo dos meus desafios e conquistas.

Ao meu esposo **Guaracy** que a sua maneira acreditou e participou do início da minha carreira profissional e científica. Pela contribuição e auxílio principalmente em relação às dificuldades encontradas com a informática. Muito obrigada!

A minha grande amiga e companheira de todos os momentos da minha vida **Karine** pela compreensão, amor, fidelidade, carinho, atenção, confiança, amizade que completa a minha vida diariamente.

As amigas **Lucyana** e **Yzila** pelos ensinamentos na bancada com as análises de própolis. Por me ensinar, explicar todas as metodologias necessárias, pela paciência e tolerância nos dias difíceis. A Lú, por estar ao meu lado desde a graduação até o mestrado, participando juntas das disciplinas, trabalhos, estresses e alegrias. A Yzila por sempre me socorrer com palavras amigas e acalentadoras, e por ajudar a tornar este sonho possível. Amo vocês!!!!

Aos **colegas de Mestrado**, pelo convívio salutar, momentos de descontração e pelo companheirismo durante os momentos difíceis.

A minha **Tia Maria Helena e Tio Newton**, por participar da minha educação e acolher em todos os momentos que necessitei. A gratidão é infinita diante de tanto amor e carinho recebidos por vocês.

Aos primos **Tales e Tina, Renata e Breno, Gustavo e Renata Maciel**, por acreditar que seria possível a realização dos meus sonhos e por contribuir para a realização dos mesmos.

Aos quase pais, **Jackson Melo e Margarida**, pelo amor e incentivo constante. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, sempre acreditando e participando dos meus estudos e sonhos. Meu muito obrigada pelo carinho e amor a mim depositado.

A minha amiga **Aline**, por todos os momentos de alegria e descontração e pela constante manifestação de amizade.

Aos **professores** da pós-graduação, pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos.

A **Prof. Dra. Margarete Gomes Zanardo**, pela participação em todas as bancas acrescentando de forma ímpar a melhora na escrita, sempre auxiliando e contribuindo para o meu crescimento científico. A **Prof. Dra. Luciana Valente**, pelas correções realizadas e por estar sempre disposta a me ajudar durante os trabalhos..

A **Prof. Dra Cláudia Moura de Melo**, por sempre acreditar em mim e acompanhar mesmo de longe o meu crescimento profissional. Você foi à precursora de tudo e merece todo o meu carinho, respeito e admiração.

Aos colegas do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural, em especial a **Rose Nely** pela amizade e solidariedade nos momentos bons e ruins ao longo deste trabalho. E por contribuir de maneira grandiosa para a realização desta dissertação.

A **Prof. Dra. Andrea Ferreira Soares** pela valorosa orientação emprestada durante a fase experimental deste trabalho, e pela contribuição intensa e imprescindível na elaboração do artigo científico.

Aos estagiários **Laise, Paulinha, Davi, Ithyara, Sandro, Esaú, Márcia e Cássio** pelo trabalho incansável semanalmente, inclusive nos feriados. Sem vocês seria impossível a realização deste projeto.

Aos funcionários da Pró-Reitoria Adjunta de Pós-Graduação e Pesquisa, em especial **Thayze e Ana**, bem como do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), particularmente **Joilma, Darci e Fabiana** (*in memorian*), pela prestatividade, carinho e atenção ao longo desta jornada.

Ao meu amigo **Hugo** o qual aprendi a amar e respeitar ao longo do mestrado. Estar ao seu lado é imensamente gratificante, contribuindo com meu crescimento pessoal e profissional. Você é especial!

A amiga **Shirlei**, por todas as experiências vivenciadas, pelos conselhos e ensinamentos que ficarão guardados em meu coração.

Ao Prof. **Dr. Emerson Fioretto** pela disponibilidade a atenção dispensada. Pela amizade e carinho que sempre teve por mim.

Aos **amigos** que indiretamente compartilharam comigo este momento, muito obrigada.

A **Fapitec** pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	18
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 Câncer Oral	21
1.2 Ciclo Celular e Oncogênese	23
1.3 Carcinogênese Química Experimental	25
1.4 Quimioprevenção com Produtos Naturais	28
1.5 Própolis	31
1.6 Própolis Verde	32
1.7 Própolis Vermelha	33
1.8 Própolis como Agente Quimiopreventivo	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Coleta de própolis	39
2.2 Obtenção dos extratos de própolis	40
2.3 Determinação de flavonóides totais	40
2.4 Ensaio Biológico	41
2.5 Acondicionamento dos animais	41
2.6 Procedimento de indução de carcinogênese química	42
2.7 Administração de gavagem	42
2.8 Procedimento de análise histomorfológica dos espécimes	43
2.9 Análise Estatística	44
3. RESULTADOS	46
4. DISCUSSÃO	54

5. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	84
A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	84

LISTA DE QUADROS E TABELAS

		Pg.
Quadro 1	Distribuição dos grupos experimentais	41
Tabela 1	Determinação do rendimento e teor de flavonóides nas amostras de própolis verde e vermelha.	46
Tabela 2	Análise dos escores médios das alterações histopatológicas epiteliais e classificação de acordo com a OMS e Sistema Binário	47

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1	Esquema do Ciclo Celular 23
Figura 2	Coleta da Própolis Vermelha (a/b)– Caixa com coletor para própolis, caixas de Langstrot localizada no apiário do povoado Brejão dos Negros, Município Brejo Grande/SE. (c/d) Amostra de própolis coletada foi armazenada e enviada para o laboratório. 39
Figura 3	Procedimento de indução da carcinogênese experimental. (a) Procedimentos de pincelamento do DMBA no dorso lingual de rato Wistar. (b) Detalhe do método de retração da língua para exposição adequada do dorso lingual. 42
Figura 4	Procedimento de gavagem. (a) Posicionamento da seringa com cânula de gavagem para ratos. (b) Procedimento de administração de água (CTR 1) com o mesmo aparato. 43
Figura 5	Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais dos grupos CTR1 (a) e CTR2 (b) exibindo características usuais. Notar cristas epiteliais altas, hiperqueratinizadas e papilas longas, de base romba. (HE, 200x). 47
Figura 6	Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo CTR3 exibindo discretas alterações arquiteturais, como hiperplasia basilar focal (setas). (HE, 200x). 48
Figura 7	Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo TUM1 exibindo extensas alterações citoarquiteturais. Note a formação de papilas intensamente estranguladas em forma de gota (pg), áreas de proeminente apinhamento de células com núcleos hipercromaticos de aspecto basalóide (ac) e pecilocarinose no estrato espinhoso alto (seta). A superfície epitelial perdeu sua organização em papilas e se mostra hiperqueratinizada (hq) (HE, 200x). 49
Figura 8	Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo TUM1 exibindo patente duplicação da camada basal ou hiperplasia basilar (hb), mitoses no estrato epitelial espinhoso 50

Figura 9	Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo TUM2 exibindo extensas alterações citoarquiteturais similares àsquelas observadas no grupo TUM 1 (HE, 200x).	51
Figura 10	Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo PROP1 exibindo pleomorfismo e hiperchromatismo no terço inferior epitelial, com destaque para a formação de papilas estranguladas em forma de gota (HE, 200x).	52
Figura 11	Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo PROP2 (a), PROP3 (b) e PROP4 (c/d). Observe desarranjo arquitetural das camadas epiteliais inferiores, apinhamento de células basalóides e áreas de acantose. Individualmente, muitos núcleos de células parabasais se mostram hiperchromáticos e levemente pleomórficos. (HE, 200x).	53

LISTA DE ABREVIATÖES

DMBA- 9,10-Dimetil-1,2-Benzantraceno

EEP- Extrato Etanólico de Própolis

EHP- Extrato Hidroalcoólico de Própolis

ANOVA- Análise de Variância

OMS- Organização Mundial de Saúde

WHO- World Health Organization

INCA- Instituto Nacional do Câncer

HPA- Hidrocarboneto Policíclico Aromático

v.o – Veículo de administração via oral

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

LMBE- Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural

ITP – Instituto de Tecnologia e Pesquisa

UNIT – Universidade Tiradentes

US - Ultrassom

EFEITO QUIMIOPREVENTIVO DE VARIEDADES DE PRÓPOLIS SOBRE A CARCINOGENESE ORAL EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA

DANIELLE RODRIGUES RIBEIRO CAVALCANTE

Estudos têm demonstrado que componentes hidrossolúveis da própolis, como flavonóides, apresentam atividade antitumoral. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito da administração oral de extrato hidroalcoólico de própolis verde e vermelha sobre displasias epiteliais linguais quimicamente induzidas em ratos. **MÉTODO:** Nesta pesquisa experimental quantitativa, foi pincelado DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) no dorso lingual de ratos 3x/semana, e, em dias alternados, administrado 100 (PROP1), 200 (PROP2) e 300 mg/kg (PROP3) de EHP verde e 100 mg/kg da vermelha (PROP4) (v.o.), durante 20 semanas. A substituição do EHP ou DMBA pelos seus veículos foi usada nos controles positivos (TUM1 e TUM2) e negativos (CTR1 e CTR2), respectivamente. O epitélio lingual foi analisado histologicamente, graduado pelo Sistema Binário e classificação OMS, e os dados comparados por análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** A média do rendimento das variedades de própolis foi de 42% e o teor de flavonóides $0,95 \pm 0,44\%$ para própolis verde e $0,13 \pm 0,11\%$ para variedade vermelha. Segundo o Sistema Binário, TUM1, TUM2 e PROP1 foram considerados lesões de alto risco, apresentando índices de alterações morfológicas significativamente mais elevados ($p < 0,05$), e os demais de baixo risco. Segundo a classificação OMS, observou-se displasia moderada em TUM1 e TUM2, leve em PROP1, PROP2, PROP3 e PROP4, e ausente em CTR1 e CTR2. **CONCLUSÃO:** Sugere-se que os EHP possam desempenhar um papel protetor importante durante a carcinogênese lingual quimicamente induzida em ratos.

Palavras-chave: DMBA, Própolis, Câncer Oral. xv

CHEMOPREVENTIVE EFFECTS OF BRAZILIAN PROPOLIS VARIETIES ON EXPERIMENTALLY INDUCED ORAL CARCINOGENESIS

DANIELLE RODRIGUES RIBEIRO CAVALCANTE

Studies have demonstrated that compounds of propolis such as flavonoids present antitumoral activity. **AIMS:** To evaluate the effect of the oral administration hydroalcoholic extract of green and red propolis on epithelial dysplasias chemically induced rat tongues. **METHODS:** In this experimental investigation, DMBA was brushed on the lingual dorsum rats 3x/week, alternated days, 100 (PROP1), 200 (PROP2) and 300 mg/kg (PROP3) of green EHP, and 100 mg/Kg of red EHP were administered by oral via for 20 weeks. The substitution of the EHP or DMBA was applied as positive (TUM1 and TUM2), negative controls (CTR1 and CTR2), respectively. The lingual epithelium was histologically analyzed, graded according the binary system and WHO classification, and the data were compared by (ANOVA) * $p < 0.05$). **RESULTS:** The average yield of the varieties of propolis was 42% and the flavonoid content of $0.95 \pm 0.44\%$ for green propolis and $0.13 \pm 0.11\%$ for red variety. According to the Binary System, TUM1, TUM2 and PROP1 were regarded as high risk lesions, since presented indexes of morphological alterations significantly higher than the other groups ($p < 0.05$), considered as low risk lesions. In accordance to the WHO classification, was observed moderate dysplasia TUM1 and TUM2, mild dysplasia PROP1, PROP2, PROP3 and PROP4, non-dysplastic epithelium in CTR1 and CTR2. **CONCLUSION:** The EHP seems to play an important protective role during the chemically-induced lingual carcinogenesis in rats.

Key-Words: DMBA, Propolis, Oral Cancer.



INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

Na sociedade moderna, os processos de urbanização e industrialização expõem a população a frequentes agentes potencialmente cancerígenos (FREITA *et al.*, 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010), estima-se que no biênio 2010/2011 ocorram 489.270 novos casos de câncer no Brasil.

De acordo com as estatísticas mundiais, aproximadamente 10% dos tumores malignos no corpo humano estão localizados na boca, sendo o câncer oral o sexto tipo mais incidente no mundo (SYRJANEN, 2005). No ano de 2002, mais de 274 mil novos casos de câncer bucal foram diagnosticados e aproximadamente 128 mil pacientes vieram a óbito por este tipo de neoplasia (PARKIN *et al.*, 2005).

Fatores de risco como tabagismo e a ingestão de bebidas alcoólicas, atuam de forma a induzir alterações genéticas, ocasionando inúmeras mutações e permanentes agressões ao genoma celular. Essas alterações estão associadas ao processo de transformação maligna clonal, que por sua vez está relacionada com a desregulação do processo de diferenciação celular, controle de proliferação e ou reparo da molécula de DNA (FREITA *et al.*, 2005). Assim, tais alterações são traduzidas como neoplasias. O processo de indução de neoplasias malignas é denominado carcinogênese (RODRIGUES *et al.*, 1999).

Os carcinomas epidermóides ou espinocelulares (CEC) são as neoplasias orais mais frequentes, correspondendo a 90% dos casos (SCULLY *et al.*, 2000; BIRNER *et al.*, 2001; KUFFER; LOMBARDI, 2002), são encontrados com mais frequência na mucosa oral, nas regiões da língua, lábio e assoalho bucal (KUFFER; LOMBARDI, 2002).

Dentre as novas propostas terapêuticas, pesquisadores investigam o potencial terapêutico e, particularmente, quimiopreventivo de produtos naturais com intuito de minimizar as dificuldades encontradas durante o tratamento de pacientes com câncer (CRAGG *et al.*, 2009).

As dificuldades encontradas no tratamento do câncer de boca, por muitas vezes ocasionam mutilações ao paciente, inabilitando-o definitivamente ou não para a reintegração familiar, social e profissional. Novas alternativas terapêuticas têm sido pesquisadas por meio de modelos experimentais de câncer de boca. Carcinogênese quimicamente induzida pelo 9,10 Dimetil 1,2-Benzantraceno (DMBA) comporta-se como um iniciador da carcinogênese, diminuindo o período de latência deste processo celular (SACKS, 1996; NAUTA *et al.*, 1997; LIMA; TAVEIRA, 1999; UMEDA *et al.*, 2001).



A própolis é um produto natural resinoso produzido por abelhas *Apis mellifera* L., e vem sendo amplamente utilizada na medicina popular por séculos em razão de suas propriedades antibacterianas, antioxidantes e antiulcerogênicas. As propriedades antitumorais recebem maior destaque nos últimos anos (KHALIL, 2006), sendo normalmente utilizada na forma de extratos (SILICI; KUTLUCA, 2005).

Os extratos etanólicos de própolis (EEP) representam uma das mais ricas fontes de ácidos fenólicos e flavonóides, os quais apresentam ampla gama de atividades biológicas, incluindo imunopotenciação, quimioprevenção e efeitos antitumorais. Estudos experimentais demonstram que os flavonóides da própolis podem induzir a morte de linhagens de células tumorais humanas, atestando sua atividade antineoplásica e sugerindo um provável potencial quimiopreventivo para este produto (SHA *et al.*, 2009).

Diante do exposto, este trabalho visa verificar o potencial quimiopreventivo do extrato hidroalcoólico variedades de própolis sobre o processo de carcinogênese experimental oral, enfatizando o retardo ou inibição da formação de fenótipo displásico no estrato epitelial.



REVISÃO DA LITERATURA



1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1.1 Câncer Oral

A terminologia câncer é dada a um conjunto de doenças, que têm como característica comum, o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, e podem afetar também outras regiões do corpo (INCA, 2009).

Considera-se o câncer oral como o mais comum em todo o mundo, ocupando o 6º lugar de acordo com sua incidência (HUMPHRIS *et al.*, 2004). No Brasil é o 5º tipo mais comum entre os homens, e o 7º entre as mulheres (INCA, 2010). O Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima que haverá 14.120 novos casos de câncer de boca em 2010, sendo 10.330 em homens e 3.790 em mulheres. De acordo com o instituto, em 2007, a doença causou 6.064 mortes, acometendo 4.814 homens e 1.250 mulheres (INCA, 2009).

O câncer bucal, excluindo o câncer de pele, pode ser considerado o mais comum da região de cabeça e pescoço, representando cerca de 38% das malignidades neste sítio anatômico. Esta neoplasia tem predominância no sexo masculino, e com 75% dos casos diagnosticados na faixa etária dos 60 anos (CARVALHO *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2002; e DEDIVITIS *et al.*, 2004), Aproximadamente 95% dos casos de câncer de boca são originados no estrato epitelial de revestimento oral e constituem, portanto, carcinomas epidermóides ou espinocelulares (CEC) (NEVILLE *et al.*, 2009).

Mais de 10 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados durante o ano 2000 em todo o mundo, cerca de 900 mil só nos EUA; já no Brasil, foram registrados pelo Ministério da Saúde 114 óbitos por câncer para cada 100 mil habitantes em 1999 (WARD, 2002). O Ministério da Saúde, por meio do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2010), estima que no biênio 2010/2011 ocorram 489.270 novos casos de câncer no Brasil. Em nível nacional, essa doença se apresenta como um grave desafio para a saúde pública, em virtude da sua elevada incidência, que se contrapõe às possibilidades de prevenção.

Vem sendo evidenciada uma tendência ao aumento significativo nas taxas de incidência e mortalidade do câncer de boca, sendo consideradas umas das mais altas em todo o mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Portanto, as neoplasias malignas da cavidade oral podem ser consideradas um grave problema de saúde pública no Brasil.

A etiologia do câncer ainda permanece obscura, no entanto, sabe-se que as principais causas das neoplasias são atribuíveis a influências ambientais, particularmente aquelas relacionadas ao estilo de vida de cada indivíduo (ALVES *et al.*, 2004), que podem



ser determinantes para o desenvolvimento de neoplasias e também para prevenção da doença (OLIVEIRA, 2006).

Nas últimas décadas, vem ocorrendo um grande interesse dos estudiosos em quadros clinicopatológicos cujas expressões morfológicas precedem o Carcinoma Epidermóide Oral, como por exemplo, as lesões potencialmente malignizantes e pré-malignas (RUIZ MENDEZ *et al.*, 1989; GERVASIO *et al.*, 2001; COLETTA *et al.*, 2002; NEVILLE *et al.*, 2009).

Define-se como 'lesões orais potencialmente malignas' (OPML), as lesões pré-malignas presentes na cavidade oral, as quais podem evoluir a carcinoma maligno devido a alterações genéticas (JIN *et al.*, 1999; BRAAKHUIS *et al.*, 2003; PETERSEN, 2005). Lesões orais comuns como a linha alba, leucoedema e queratose de atrito raramente evoluem malignamente, no entanto consideram-se pré-malignas as leucoplasias e as eritroplasias, as quais, devido às suas características clínicas variantes, necessita o exame histopatológico para a identificação do potencial de malignidade (WARNAKULASURIYA 2007; AXELL, 2009; CERVIGNE, 2009).

Desta maneira, a classificação displásica das células do epitélio da mucosa oral torna-se um grande desafio para os patologistas no sentido de indicar com precisão as lesões com maior ou menor potencial maligno. A falta de objetividade de alguns métodos de graduação das displasias epiteliais na classificação das lesões tende a superestimar a gradação das alterações citomorfológicas. Neste ínterim, observa-se ainda a existência de discordâncias de arbitrariedade das graduações, falta de calibração dos critérios de análise bem como a determinação da importância de cada critério na caracterização do potencial maligno (REIBEL, 2003; KUJAN *et al.*, 2007; SCHUSSEL, 2010).

Segundo Schussel, (2010), a busca por melhores métodos de graduação das displasias epiteliais da mucosa oral é contínuo, sendo assim estabeleceu-se em 2005 pelo Grupo de Consenso em Displasia Epitelial Oral da OMS, uma escala para graduação com 5 pontos: (1) hiperplasia; (2) displasia epitelial discreta; (3) displasia epitelial moderada; (4) displasia epitelial intensa; e (5) carcinoma *in situ*.

No ano de 2006, Kujan *et al.*, propuseram, a partir desta escala, um novo sistema binário de graduação de "baixo risco" e "alto risco", baseado nos mesmos critérios citológicos e arquiteturais estabelecidos pela OMS. Para a validação deste método, estudos de Kujan *et al.*, (2006; 2007) mostraram que houve maior concordância entre o diagnóstico histopatológico e prognóstico das lesões estudadas por eles, e também maior concordância entre observadores envolvidos no estudo.



1.2 Ciclo Celular e Oncogênese

De acordo com Ward (2002), o câncer é resultado de alterações genéticas e é transmitida da célula alterada para sua prole. Sabe-se que milhões de células sofrem divisão celular diariamente, e a cada divisão, o organismo fica exposto a uma série de mutações, sejam elas carcinógenas ou não. Isso acontece porque a célula para se tornar cancerígena precisa romper muitas barreiras fisiológicas. Os pontos de controle do ciclo celular são considerados as barreiras primárias para que a célula complete o seu ciclo.

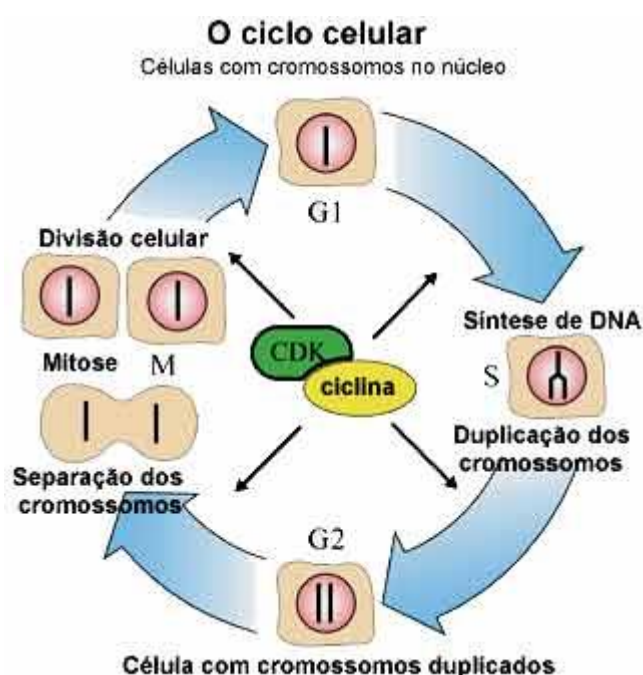


Figura 1. Esquema do Ciclo Celular.

Fonte: ALBERTS, B. 2002.

O ciclo celular é composto por quatro estágios: O primeiro é a fase G1 (gap 1= interfase) o qual a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar seu DNA. A duplicação do material genético (replicação dos cromossomos) ocorre na fase seguinte, chamada de S (síntese). Após a replicação dos cromossomos, inicia-se a fase G2 (gap 2), onde a célula prepara-se para a fase M (mitose) na qual a célula-mãe se divide ao meio, para produzir duas células-filhas, com o mesmo número de cromossomos (Figura 1). Imediatamente as duas células-filhas produzidas entram na fase G1 podendo reiniciar o ciclo celular, ou entram em G0 (repouso replicativo) (ALBERTS, 2002).



A fase G1 possui um ponto de checagem, G1/S, controlado por um grupo de proteínas que compõem a via do pRb (proteína do retinoblastoma). Caso a célula passe por este ponto onde ela é compelida a replicar o seu DNA e isso não ocorra ou aconteça uma cópia incorreta do DNA durante S, ou mesmo lesão do DNA, a célula não passará para o próximo ponto de checagem (G2/M); ocorrerá, então, a paralisação do ciclo e indução de apoptose pelo gene *p53*. Diversas proteínas inibidoras fazem parte deste processo e podem parar o desenvolvimento do ciclo celular. Algumas, como a p15 e p16, atuam bloqueando componentes essenciais para progressão do ciclo celular, como CDK (cyclin-dependent kinases - quinases dependentes de ciclinas) e ciclinas, impedindo o avanço do ciclo da fase G1 para S. Outras, como o p21 e p53, exercem a função de monitorar a saúde celular e a integridade de seus cromossomos e até a execução correta das diferentes fases do ciclo. Caso as mutações ocorridas no conteúdo genético das células humanas ultrapassem esta defesa natural, essas mutações podem eventualmente contribuir para a formação do câncer (BRENNAN *et al.*, 2003).

Neste contexto, o desenvolvimento de células tumorais pode ocorrer quando um dos mecanismos de ação da apoptose estão prejudicados ou o controle do sistema está desregulado. Em casos, por exemplo, onde a proteína p53 é inativada através da mutação, a chance das células danificadas e/ou mutadas serem eliminadas fica bastante reduzida, iniciando o desenvolvimento de um processo carcinogênico (SEEMAYER, 1990).

Outro fator importante na formação e progressão da neoplasia é a instabilidade do genoma, pois para que a célula se torne neoplásica, ela deve sofrer uma ou mais alterações genéticas, o que leva a um relaxamento dos mecanismos de controle do crescimento e divisão. Consequentemente, as células cujos mecanismos foram alterados apresentam chance relativamente maior de desenvolver novas anormalidades genéticas, isto é, se tornam instáveis (WARD, 2002).

Segundo Videira *et al.*, (2002), proto-oncogenes são os genes responsáveis pelo controle e proliferação celular codificando produtos (oncoproteínas). Quando esses genes têm sua expressão desregulada, seja por mutação ou por translocação cromossômica, entre outros mecanismos, passam a ser denominados oncogenes e podem contribuir para a transformação neoplásica super estimulando a proliferação celular (CESCATO, 2010).

O fenômeno de oncogênese que se desenvolve nos tecidos epiteliais é denominado carcinogênese. Este processo pode ocorrer por ação de uma série de fatores etiológicos distintos, sejam eles de natureza física (como as radiações ionizantes), biológica (como vírus oncogênicos, a exemplo do HPV – Human Papilloma Vírus) e química (como



hidrocarbonetos aromáticos policíclicos derivados da combustão do tabaco) (TELLES, 1999).

1.3 Carcinogênese Química experimental

A carcinogênese secundária a exposição química foi inicialmente relatada no Sec. XVIII por meio da observação de formação de pólipos secundários ao uso excessivo de tabaco por John Hill. Do mesmo modo, Sir Percival Pott relatou altos índices de câncer de pele escrotal em limpadores de chaminé. Nesta época como medida de Saúde Pública, distribuíram-se guias com orientação sobre banhos diários para evitar-se a ocorrência de tumor por exposição contínua à fuligem (BORGES, 2009).

Ao final do século XIX a relação entre a exposição prolongada a certos produtos químicos e seus efeitos carcinogênicos era bastante evidente, incentivando-se assim investigação sistemática bem como a reprodução de tumores em animais. No entanto, comprovação científica da existência de um agente químico cancerígeno ocorreu somente em 1915, quando tumores cutâneos em coelhos foram induzidos pelo pincelamento repetido das orelhas com alcatrão de hulha (SMUCKLER, 1983; KUMAR *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Outros trabalhos sobre a carcinogênese quimicamente induzida em cobaias foram descritos por estudiosos japoneses em 1918 (MAINENTI e ROSA, 2008). Mas somente em 1942, aconteceram os experimentos com glândulas salivares animais, utilizando os HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) (CATALDO *et al.*, 1964; SHKLAR, 1970; EL-MOFTY, 1977).

Os HPAs possuem grande potencial carcinogênico e representam uma grande classe de compostos orgânicos presentes no ambiente que podem ser extraídos de combustíveis fósseis, ocorrem pela combustão incompleta do carvão mineral, tabaco, petróleo, podendo estar presentes em alguns produtos alimentícios inclusive os defumados. Os hidrocarbonetos (HPAs) requerem ativação metabólica e podem induzir tumores em uma grande variedade de tecidos e órgãos. O sistema enzimático do citocromo P-450, resulta na ativação dos HPA, sendo o metabólito final o responsável pelos efeitos citotóxicos, teratogênicos e oncogênicos (WOOLF, 1998; RODRIGUES; CAMARGO, 1999; BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2000; IDE *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2006; MAINENTI; ROSA, 2008; BORGES, 2009).



Entre os principais exemplos de HPA, destacam-se o 9,10- Dimetil 1,2-benzantraceno (DMBA), o metilcolantreno, o benzopireno e o 4-quinolina 1-óxido (4NQO). Atualmente, o produto sintético mais utilizado como um agente iniciador da carcinogênese induzida é o DMBA. Numerosos estudos têm feito uso deste produto para indução experimental de câncer nos mais diferentes sítios anatômicos, como pâncreas (WENDT, 2004), mama (COS *et al.*, 2006), boca (KAVITA *et al.*, 2006), glândulas salivares (MAINENTI; ROSA, 2008) e pele (CHAUDHARY *et al.*, 2009), dentre outros. Para indução de câncer bucal, este produto pode ser administrado topicamente ou implantado na língua dos animais, na forma de solução ou pellet diluído em diferentes produtos químicos, como a acetona ou vaselina, respectivamente (MAINENTI; ROSA, 2008).

Verificou-se em roedores após exposição ao DMBA, que uma variedade de tumores é induzida com elevada frequência. O DMBA é comumente utilizado na carcinogênese experimental em camundongos, pois o epitélio de revestimento desses animais é muito responsiva aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (WILLIAMS; IATROPOULOS, 2001; BORGES, 2009).

De acordo com Salley (1954), o DMBA já era utilizado como um hidrocarboneto policíclico para induzir carcinoma de células escamosas na mucosa de hamster. O autor aplicou o DMBA dissolvido em éter e este se apresentou como um carcinógeno bastante efetivo na indução de tumores após 16 semanas. Segundo Morris (1961) relata que cinco semanas é o tempo necessário para iniciar as análises de carcinogênese experimental. A partir disso, foi descrito quatro estágios identificados histologicamente na mucosa, que tem início por hiperplasia, papiloma, carcinoma *in situ*, até carcinoma de células escamosas (OLIVEIRA, 2009).

Segundo O'Neill (1998), o DMBA é um carcinógeno completo, pois age tanto na iniciação quanto na promoção. Isso justifica a sua ampla utilização no estudo da carcinogênese química, visto que garante o desenvolvimento de todo o processo sem a necessidade de outras substâncias coadjuvantes (BOLANHO *et al.*, 2005).

Além disso, foi constatado que 0,5% de DMBA, diluído em acetona, produz o efeito máximo de neoplasia, com o mínimo de período de latência e sem morbidade. Padronizou-se também o procedimento, de tal modo que a lesão experimental pôde ser reproduzida posteriormente (MORRIS, 1961).

O DMBA em solução de 0,5% induz hiperplasia no epitélio da mucosa oral após poucas aplicações, constatando-se pela aparência de variedades de lesões displásicas parecidas com lesões pré-malignas humanas, após seis a oito semanas de tratamento



(SANTIS *et al.*, 1964). Após algumas semanas de tratamento com DMBA, tumores benignos e malignos, lesões papilomatosas e carcinomas, especificamente de células escamosas começam a ser evidenciados (SANTIS *et al.*, 1964; GIMENEZ-CONTI; SLAGA, 1993).

Existem aspectos importantes que influenciam a dinâmica da carcinogênese química bucal experimental que merecem destaque, dentre eles as diferenças genéticas entre as espécies, os fatores ambientais, sociais e psicossociais, assim como os imunológicos (LIMA; TAVEIRA, 1999).

A carcinogênese química pode ser iniciada por diversas substâncias químicas que se divergem estruturalmente e incluem produtos naturais e sintéticos e classificam-se de acordo com a sua ação em: (1) Diretos: aqueles que não requerem transformação química para seu efeito carcinogênico ou (2) Indireto ou Procarcinógeno: os que requerem conversão metabólica *in vivo* para produção de carcinógenos finais, os quais são capazes de transformar as células. Apesar das classificações, ambas as ações têm uma propriedade em comum: são eletrófilos (átomos deficientes em elétrons), sendo altamente reativos e podem reagir com locais nucleofílicos (átomos ricos em elétrons) na célula. Estas reações não são feitas por enzimas e resultam na formação de produtos de reação covalentes. As reações eletrofílicas podem ocorrer em estruturas ou macromoléculas ricas em elétrons na célula-alvo, incluindo DNA, RNA e proteínas, produzindo às vezes um dano letal. Nas células iniciadas, a interação é obviamente não-letal, e o DNA é o alvo primário (BARRET *et al.*, 1993; BIGNOLD, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

Os processos de indução da carcinogênese são amplamente estudados na literatura; havendo consenso em relação ao papel do ciclo celular neste processo. Para que os tumores ocorram é fundamental a existência de duas fases distintas: a primeira representada pelo processo de iniciação, no qual as células normais são convertidas em células tumorais latentes em um curto período de tempo, sob a ação química de uma substância carcinogênica. E a segunda fase é a promoção na qual as células tumorais latentes são estimuladas a progredir, após um longo período de tempo por ação repetitiva de uma determinada substância atuando na mucosa bucal. (ODUKOYA; SHKALAR, 1984; STEILDLER; READE, 1986; MATIAKIS *et al.*, 1994; SHKLAR, 1999; ALBERT, 2002; LORO; WINTERMYR; JOHANNESSEN, 2003).

Na segunda metade da década de 1960, muitos dos conceitos de iniciação, promoção e progressão já estavam estabelecidos. Houve um acréscimo considerável no conhecimento sobre carcinógenos e seu metabolismo, sobre a biologia e a bioquímica de células malignas, mas quase nada se sabia sobre a genética tumoral e a clonagem gênica.



Diversos avanços no conhecimento dos mecanismos da carcinogênese seguiram a identificação dos oncogenes celulares (HIRST; BALMAIN, 2004).

Pode-se inferir que a pesquisa em carcinogênese química durante a década de 1970 estava focada no desenvolvimento e aprimoramento de modelos animais para neoplasias induzidas quimicamente em órgãos específicos. Nesses modelos procurava-se desenvolver neoplasias o mais parecido possível ao desenvolvimento tumoral em humanos (YUSPA; POIRIER, 1988).

Algumas vantagens em relação a esta metodologia experimental têm sido demonstradas através de estudos, ressaltando-se os seguintes fatores: a técnica para a indução dos carcinomas é de fácil manuseio, permite a visualização em relação à lesão que está se desenvolvendo, pode-se analisar uma região mais ampla, similaridade entre as alterações microscópicas, bioquímicas e moleculares com a mucosa bucal humana e finalmente resposta tecidual bastante similar em relação aos agentes profiláticos e terapêuticos. Essas vantagens na utilização do modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida tem importante contribuição em relação ao tratamento clínico de pacientes com câncer bucal (GIMENEZ-CONTI, 1993; SCHWARTZ *et al.*, 2004; MOHAN *et al.*, 2007).

1.4 Quimioprevenção com produtos naturais

Os químicos no início dos tempos já estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporada às farmacopéias daquela época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas (YUNES *et al.*, 2001). Assim, dada a devida importância das plantas para a medicina da época, a Química e a Medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos (YUNES *et al.*, 2001). Desta maneira, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos (VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

A utilização das plantas como fins terapêuticos acompanha a história da humanidade e, apesar do enorme desenvolvimento da síntese química das indústrias farmacêuticas atualmente, 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. Entre o período de 2001 e 2002, aproximadamente um quarto dos fármacos mais vendidos em todo mundo eram obtidos diretamente ou derivados de fontes naturais (BALUNAS, 2005). Das novas substâncias químicas descobertas entre 1981 e 2002, 30% são produtos naturais em sua essência ou derivados. Outros 20% dessas novas moléculas são produtos sintéticos mimetizando estruturas encontradas na natureza (NEWMAN *et al.*, 2003; BALUNAS, 2005).



Segundo Carvalho (2006), diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal: a descoberta de compostos eficazes para produção de fármacos no combate ao câncer; estudos sobre a biodiversidade; o difícil acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que vias alternativas mais baratas sejam oferecidas. Com isso, a busca por novas terapias antitumorais aumentam a cada ano.

Nos tempos atuais, evidências clínicas mais significantes do valor das plantas no tratamento do câncer permitem a reconstrução da história destas plantas e seu uso nesses casos (NOBILI *et al.*, 2009).

Nos últimos vinte anos o interesse da indústria farmacêutica esteve voltado para os produtos naturais, dentre os quimioterápicos para o câncer destaca-se a vimblastina e da vincristina (extraídas de *Catharrantus roseus*), o etoposídeo, o teniposídeo e o Taxol® (VIEGAS JR. *et al.*, 2006). Outro composto de importância histórica foi isolado pela primeira vez segundo Wall; Wani *et al.*, (1966), a partir de uma árvore chinesa *Camptotheca acuminata*, denominada camptotecina (OBERLIES; KROLL, 2004).

Entre 1967 e 1971, o taxol (paclitaxel) foi identificado e novamente isolado das cascas de *T. brevifolia*. Mas logo nos primeiros estudos sobre sua potencialidade como um novo agente antineoplásico, este fármaco foi questionado a viabilidade face à complexidade de sua estrutura e à relativa escassez da fonte natural (WALL; WANI, 1998). O custo benefício não era interessante, pois, para se extrair 1 kg de taxol, precisaria em média de 10 t de cascas de *T. brevifolia*, o que representa cerca de 3000 árvores (AVERY; CHONG, 1992). Estes dados causaram forte impacto aos ambientalistas entre os anos de 1985 e 1995, e como consequência foi imposto pelo “Forest Service Bureau of Land Management” (EUA) restrições ao acesso à planta, para motivar os estudiosos a encontrar fontes naturais alternativas para o taxol. Mas em 1994, houve insucesso nestas iniciativas que culminou a Bristol-Myers Squibb interromper o uso das cascas de *T. brevifolia* (WALL; WANI, 1998).

A mais nova ferramenta farmacológica nas últimas décadas no que diz respeito ao tratamento dos pacientes com câncer é a quimioprevenção, tendo como objetivo identificar quais substâncias poderia inibir ou retardar o desenvolvimento tumoral ainda nos estágios iniciais; evitando o estabelecimento da neoplasia em seus mais variados graus de diferenciação. (RUI, 1997; KATIYAR; MUKHTAR, 1997; BOONE; YOU, 1997; NISHINO, 1997; BALASENTHIL *et al.*, 1999; SHABANY *et al.*, 2002; MOHAN *et al.*, 2005; LAMBERT *et al.*, 2005; MOHAN *et al.*, 2006; MANOHARAN *et al.*, 2006; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE; IGNACIMUTHU, 2006).

Os agentes hoje conhecidos como antineoplásicos, podem ser classificados em dois grupos: O primeiro exerce função de inibir a iniciação do processo carcinogênico e o segundo, inibir a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer.



Muitos agentes do primeiro grupo são encontrados em alimentos, como os diterpenos do café e os ácidos sulfídicos do alho (DUVOIX *et al.*, 2005). Outro exemplo clássico de quimioprevenção (como é denominada a ação desses agentes) é o elevado consumo do chá verde no oriente, cujos polifenóis possuem atividade comprovada em diversos sistemas fisiológicos (LAMBERT *et al.*, 2005). Já os agentes supressores são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença (DUVOIX *et al.*, 2005).

Uma grande gama de fitoterápicos com ação antitumoral tem sido descrita na literatura: a Epipodofilotoxina, um isômero da podofilotoxina, foi isolada como um agente antitumoral ativo das raízes das espécies do gênero *Podophyllum*, *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum emodi* (Berberidaceae) (STAHELIN, 1973). Etoposídeo e teniposídeo são dois derivados de produtos naturais, semi-sintéticos da epipodofilotoxina e são usados no tratamento de linfomas e câncer brônquico e testicular (HARVEY, 1999; CRAGG; NEWMAN, 2005; SHOEB, 2006). Homoharringtonina, isolada de *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae), é um outro composto derivado de produto natural de uso clínico, para leucemia mielóide aguda e crônica (KANTARJIAN *et al.*, 1996; CRAGG; NEWMAN, 2005; ITOKAWA; WANG; LEE, 2005).

Outros compostos bioativos que têm recebido destaque em estudos de quimioprevenção são os terpenóides. Esses compostos formam uma família ampla e estruturalmente diversa de produtos naturais derivados de unidades do isopreno (C_5) unidos de modo cabeça-calda. O isopreno tem sido caracterizado como um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos naturais e foi sugerido como a unidade fundamental de construção. São classificados como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (DEWICK, 2002).

Algumas dessas substâncias isoladas de diversas espécies têm demonstrado atividades biológicas interessantes, como: citotóxica em várias linhagens de células tumorais (BLOCK *et al.*, 2004; GRAIKOU *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005), dentre elas, células de câncer de colo uterino (HeLa) (BLOCK *et al.*, 2002), carcinoma epidermóide oral humano (KB), adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), carcinoma de pulmão (H460), e astrocitoma humano (SF-268) (LI *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi reportado um diterpeno trachylobano capaz de induzir apoptose em células de leucemia promielocítica humana, HL60 e apresentou atividade antitumoral *in vitro*, frente células tumorais malignas da linhagem sarcoma180 (BLOCK *et al.*, 2004; PITA, 2010).



1.5 Própolis

Os produtos naturais são fontes importantes para o desenvolvimento de novas drogas segundo Newman *et al.*, (2002), possibilitando o avanço na descoberta de agentes terapêuticos para doenças como câncer, imunodeficiências e outras (CLARDY; WALSH, 2004). A própolis é um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade, a qual é administrada sob diversas formas (PEREIRA *et al.*, 2002).

O emprego da própolis pelos indivíduos já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No primeiro texto médico conhecido por "Livro de produção de Medicamentos para todas as partes do Corpo Humano", narrado no papiro de Ebers e escrito há cerca de 1.700 a.C., se faz menção à própolis como um produto medicinal (ADELMANN, 2005), e era também utilizada no antigo Egito, como um dos materiais para embalsamar os mortos ("cera negra") (PEREIRA *et al.*, 2002).

A própolis tem sua principal origem em secreções vegetais (OLIVEIRA; BASTOS, 1999). Segundo Marcucci (1999), o material disponível para as abelhas elaborarem a própolis é produzido através de uma variedade de processos fisiológicos em diferentes partes da planta. Apesar de ainda hoje existirem poucas referências na literatura sobre a origem botânica da própolis, algumas espécies vegetais já foram citadas por alguns autores na década de 90. Dentre eles, Crane (1990) apresenta uma lista de espécies de plantas de várias partes do mundo. Também Oliveira e Bastos (1999), citam algumas espécies que hoje são conhecidas. São elas: na Europa *Populus*, *Betula*, *Alnus*, *Quercus*, *Salix*; nos Estados Unidos *Populus* e *Pinus*; no sul da África *Populus deltoides* (exótica) e *Acacia karroo*; nas ilhas do Havai *Plumeria*, *Eucaliptus*, *Schinus terebinthifolius* e *Psidium guajaba* (sendo estas três últimas exóticas no Brasil). São ainda citadas *Araucaria heterophylla*, *Clusia minor* e *Clusia major* como fontes de resinas coletadas pelas abelhas no Brasil (BANSKOTA *et al.*, 1998).

Coletada de diversas partes das plantas por abelhas africanizadas *Apis mellifera* L., a própolis é uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa, e tem sido empregada popularmente como agente terapêutico na medicina alternativa (SILVA, 2008). A sua formação se dá por misturas complexas de substâncias coletadas de várias plantas pelas abelhas operárias, que elaboram a própolis e depositam em seus ninhos para vedação da colméia (LONGHINI, 2007). A própolis tornou-se um produto importante na medicina alternativa e complementar na metade dos anos 80 segundo Lustosa (2007).



A coloração da própolis depende da sua origem botânica, e pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo de seu tipo e idade (ADELMANN, 2005).

1.6 Própolis Verde

A própolis brasileira produzida no cerrado, rica em derivados prenilados do ácido-*p*-cumárico (BANKOVA; MARCUCCI, 1999), é conhecida internacionalmente como própolis verde ou *green propolis*, a qual tem como principal fonte vegetal a espécie de *Baccharis dracunculifolia* D.C., possuindo uma coloração característica, contribuindo desta maneira para sua rápida identificação no processo de comercialização (PARK *et al.*, 2002). A própolis verde é muito consumida no Japão e é bastante utilizado como suplemento alimentar na prevenção de doenças devido as suas ótimas características organolépticas (SOUSA *et al.*, 2007).

A importância medicinal e econômica da própolis é grande, sendo comercializada de várias maneiras (preparações farmacêuticas e cosméticas), tais como: comprimidos, pomadas, pastilhas, dentifrícios, cremes faciais, loções, tinturas, etc. (BANKOVA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002). Desta maneira, tem sido observado um aumento significativo do interesse da população pelo produto, e do número de criadores de abelhas que investe na melhoria da produção da própolis e de empresas processadoras deste material (PEREIRA *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2007).

Devido a todo processo ocorrido para sua produção, a própolis é considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais. Atualmente, mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis (BURDOCK, 1998). Mas, segundo Silva (2008), essa classificação ainda é questionada, uma vez que as abelhas podem coletar resina numa grande variedade de plantas, dada a imensa diversidade da flora brasileira.

Segundo Dausch *et al.* (2007), a presença de flavonóides na composição da própolis, atribui à mesma ações biológicas como: efeito antimicrobiano, antimicótico, imunomodular, cicatrizante e antioxidante. Deste modo, infere-se que, as propriedades biológicas e farmacológicas da própolis estão diretamente ligadas à sua composição química (ADELMANN, 2005). Estes biopolifenóis têm mostrado também sua habilidade de proteção contra os danos causados pelos radicais livres, pois não interferem apenas na propagação da reação, mas na sua formação, tanto quelando os metais de transição quanto pela inibição de enzimas envolvidas nesse processo (RUSSO *et al.*, 2002).



A atividade antineoplásica da própolis é estudada devido ao provável potencial antiproliferativo, relacionada à atividade anticâncer dos flavonóides tais como a quercetina, bicalcaina, genisteína, tangeritina e soforanona que promovem a indução da apoptose (CHEN; WU; LIN, 2004).

De acordo com Li *et al.*, (2007), os extratos etanólicos de própolis (EEP) demonstraram inibir o crescimento de células neoplásicas de tumores prostáticos humanos, e destacaram que tal atividade biológica estava diretamente relacionada a inibição de oncoproteínas envolvidas no ciclo celular, tais como a ciclina D1, B1 e p21. Os autores concluem que a própolis teria amplo potencial não apenas como quimioterápico, mas também como quimioprotetores contra cânceres de próstata.

A maioria dos estudos foram realizados com a própolis verde, por ser bem caracterizada e conhecida em todo o mundo (LUSTOSA, 2007). Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

Os diversos tipos de própolis brasileira foram primeiramente classificados em 12 grupos de acordo com suas características físico-químicas (Park *et al.*, 2002). Segundo Dausch (2007), a própolis de coloração vermelha encontrada no litoral do Brasil foi classificada como o décimo terceiro grupo.

Na última década, a própolis tem sido objeto de numerosos estudos farmacológicos, os quais vêm demonstrando suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória (BANKOVA, 2005; KOSALEC *et al.*, 2005; ALENCAR *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2008). Dantas *et al.*, (2006) também relataram que a própolis mostrou-se ativa contra *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas* spp. e *Giardia lamblia* constatando sua atividade antiprotzoária. Adicionalmente, foi demonstrado que a própolis reduz a pressão arterial e os níveis de colesterol no sangue (CAPASSO e CASTALDO, 2002). Deve ser destacado que, conforme sugere Marcucci (1998), o provável fator responsável pela ampla gama de atividades biológicas apresentada pela própolis provavelmente estaria relacionada ao sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes químicos que compõem este produto natural.

1.7 Própolis Vermelha

A amplitude das atividades biológicas da própolis é maior em áreas tropicais do planeta, refletindo a diversidade vegetal destas regiões (BANKOVA, 2005). Devido à grande



biodiversidade brasileira, as variedades de própolis do Brasil foram agrupadas em 12 grupos distintos, de acordo com a composição química e atividades biológicas (PARK, 2000).

Atualmente um novo tipo de própolis proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie de leguminosa. Esta própolis, denominada de “própolis vermelha” por causa da sua coloração vermelha intensa, foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira e tem demonstrado várias atividades biológicas em ensaios *in vitro* (ALENCAR *et al.*, 2007; DAUSCH, 2007; SILVA, 2008).

Alguns trabalhos descrevendo o potencial biológico desta variedade de própolis de cor vermelha encontrada em Cuba e na Venezuela já é reportada desde a década de 90, e demonstra atividade antimicrobiana, cicatrizante e antioxidante, sendo identificados os seus antecessores botânicos como *Clusia nemorosa* e a *Clusia scrobiculata* (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

Essa variedade de própolis consiste em uma mistura complexa de material resinoso e balsâmico, e têm sido um apiterápico objeto de pesquisa e apreciada como veículo para tratamento de disfunções orgânicas, em virtude das conhecidas propriedades terapêuticas como antibacteriana, antiviral, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória. (PEREIRA *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2000; BANKOVA, 2005; KOSALEC, 2005; ALENCAR *et al.*, 2005; SIMÕES, 2008). Tais características são atribuídas aos elementos constitutivos que despertam a atenção para estudos, como os flavonóides. Sugere-se também que derivados hidrossolúveis de própolis como o ácido caféico, éster feniletil e quercetina teriam propriedades satisfatórias no que se refere ao controle do crescimento tumoral em modelos experimentais (ORSOLIC *et al.*, 2004).

A composição química da própolis é extremamente complexa e mais de 180 compostos foram identificados, destacando-se como de grande importância os flavonóides. Estes compostos fenólicos compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (DAUGSCH *et al.*, 2007). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, elasapigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina, kanferol etc. A presença e a concentração destes compostos é utilizada como índice de qualificação de amostras de própolis (AWALE *et al.*, 2008).

De acordo com relatos de Silva *et al.*, (2007), amostras de própolis vermelha oriundas do nordeste brasileiro mostram composição química diferente daquela observada



em amostras de outros países, como a Turquia (SILICI *et al.*, 2007) e Cuba (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2002). Neste estudo, os principais constituintes identificados em extratos etanólicos foram os isoflavonóides medicarpina e 3-hidroxi-8 e 9-dimetoxipterocarpana.

Nas amostras de própolis vermelha nordestina (oriundas dos estados de Alagoas, Sergipe, Bahia, Pernambuco e Paraíba) analisada por Daughsch *et al.*, (2007), os compostos majoritários identificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foram a pinocembrina, formononetina e isoliquiritigenina. Os autores ainda associaram o perfil cromatográfico com a análise palinológica da própolis vermelha e concluíram que a *Dalbergia ecastophyllum* representaria a mais provável origem botânica deste produto.

Trusheva *et al.*, (2006) analisaram amostras de própolis vermelha alagoana e observaram que este produto era rico em isoflavonóides, como a isoflavana isosativana e o pterocarpana medicarpina, de maneira similar as amostras cubanas. No entanto, os autores reforçam que a composição química deste produto apícola parece guardar uma relação bastante estreita com a flora regional e as condições ambientais do local da coleta.

Em razão dos relatos de que a composição química da própolis vermelha poderia variar de acordo com a época do ano de coleta (PEREIRA *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2008) realizaram uma avaliação sazonal de amostras pernambucana da própolis vermelha e concluíram que a sazonalidade influenciou pouco na composição deste produto. Os metabólitos secundários majoritários da própolis foram os derivados fenólicos (flavonóides, antraquinonas) e terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteróides), além da presença de açúcares.

A própolis vermelha brasileira possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e suas sub-frações produzidas parecem ser biologicamente mais ativas que as frações e o extrato etanólico. Na opinião dos autores, as atividades antioxidante e antibacteriana da própolis vermelha não representariam uma resposta ao efeito sinérgico entre os vários compostos presentes no extrato bruto (CABRAL, 2009).

Maia-Araújo (2009) avaliou o potencial antimicrobiano da própolis vermelha sergipana e observou inibição para bactérias gram positivas, enquanto que houve uma inibição reduzida para bactérias gram negativas. Além disso, também foi evidenciada uma relação direta entre a intensidade da tonalidade de vermelho da própolis e sua atividade antimicrobiana.

Pinheiro (2009) avaliou o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sergipana em modelo experimental de ulcerações gástricas induzidas por etanol e concluiu



que este apresentou efetividade contra o crescimento do *H. pylori* e evidente ação gastroprotetora, semelhante àquela promovida por omeprazol e cimetidina.

Albuquerque Júnior *et al.*, (2009) analisaram o efeito de extrato hidroalcoólico da própolis vermelha sergipana incorporada em matrizes filmogênicas de colágeno tipo I bovino sobre a cicatrização por segunda intenção em modelo experimental com ratos *Wistar*. Os autores verificaram que os filmes contendo própolis vermelha aceleraram a cronificação do processo inflamatório, estimularam a neoformação vascular e estimularam a substituição de colágeno tipo III por tipo I na área cicatricial, aprimorando substancialmente o processo de reparo.

1.8 Própolis como agente quimiopreventivo do câncer

Pesquisas com substâncias extraídas ou não de apicoterápicos como a própolis, têm sido realizadas em virtude de suas propriedades biológicas. O mais usado para análise é o extrato etanólico da própolis, que apresenta diversos compostos fenólicos e flavonóides. Um estudo preliminar mostrou que a própolis inibiu o crescimento de células U937 (leucemia humana), através de indução a apoptose. Desta maneira a própolis poderá ser útil para a quimioprevenção do câncer ou como agente quimiopreventivo (ASO *et al.*, 2004).

Demonstrou-se que a presença dos flavonóides na própolis tem ação antioxidante podendo diminuir o risco de câncer em vários sítios anatômicos sendo desta maneira uma possível alternativa terapêutica. Sugeriu-se que o composto antioxidante pode inibir a proliferação e o crescimento de células tumorais e indução do processo de apoptose (EL-KHAWAGA *et al.*, 2003)

O ácido cafeico fenil éster (CAPE) é um composto que foi isolado da própolis cuja possível ação antitumoral tem sido investigada. Acredita-se que a ação antiproliferativa da própolis em células tumorais pode ter relação direta com o efeito sinérgico dos seus constituintes. Os derivados do CAPE foram investigados no câncer oral usando cultura de células da linhagem SAS (carcinoma de células escamosas), e linhagem NHOF (fibroblastos de células humanas normais), a fim de investigar seus efeitos no padrão de crescimento celular, citotoxicidade e mudanças no ciclo celular, deste modo, observou-se que o CAPE apresentou efeito citotóxico em todas as linhas exceto a linhagem NHOF. Desta maneira, seus diferentes efeitos em células tumorais e células normais sugerem que este composto poderá ser útil na quimioterapia do câncer oral (BUFALO *et al.*, 2007).

Derivados de ácido cinâmico, como a Baccharina e Drupanina, ricos em flavonóides, também foram testados quanto a sua atividade antitumoral *in vivo* frente às células de Sarcoma S-180 cultivadas em ratos. Demonstrou-se que estes compostos isolados do ácido



cinâmico induziram morte das células tumorais, com menor genotoxicidade para as células normais hematopoiéticas do que as drogas anti-câncer normalmente utilizadas (MISHIMA, *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Orsolic *et al.*, (2005), observaram o efeito antitumoral dos componentes polifenólicos derivados das soluções aquosas da própolis em tumor ascítico de Ehrlich. Desta maneira, relataram que as soluções aquosas de própolis e seus compostos fenólicos foram efetivos na redução do tumor em relação ao número total de células na cavidade peritoneal dos animais analisados, e a administração das soluções teve influência significativa com o desenvolvimento do tumor, sugerindo mais estudos em relação aos componentes testados. Estudos realizados posteriormente comprovaram que a atividade antitumoral das soluções aquosas de própolis não é um resultado citotóxico direto para células tumorais enquanto que os polifenólicos compostos por CA e CAPE presentes na própolis afetam o crescimento tumoral embora a inibição da síntese do DNA exerça efeito antitumoral direto por contato íntimo com as células tumorais.

Pesquisas recentes mostram o papel da própolis na quimioprevenção do câncer de próstata. Demonstrou-se *in vitro* que os EEP (extrato etanólico da própolis) e os seus componentes fenólicos aumentaram o fator de necrose tumoral relacionado ao ligante de indução de apoptose (TRAIL), o qual é um agente anticancerígeno natural que induz apoptose em células cancerígenas e não-tóxico para células normais. No entanto, ainda reporta-se que mais estudos são necessários para o entendimento dos mecanismos moleculares através dos quais o EEP e seus componentes agem na sinalização celular e sensibilidade do câncer de próstata a TRAIL-apoptose induzida. Ainda assim, sugeriu-se que a modulação da via TRAIL-apoptose apresenta potencial significativo para a quimioprevenção do câncer de próstata e, a superação da resistência ao TRAIL pela própolis e seus componentes fenólicos possam ser os mecanismos responsáveis pela prevenção aos efeitos do câncer, deste modo, reportou-se que a suplementação da dieta com EEP possa ser útil como agente quimiprotetor contra o câncer de próstata. (SZLISZKA, *et al.*, 2009).

Considerando todos esses aspectos, o espaço e a importância que os produtos naturais ocupam na indústria farmacêutica fica bem evidente, sendo fonte de novas pesquisas para o tratamento do câncer ou pela quimioprevenção (PITA, 2010).



MATERIAL E MÉTODOS



2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste projeto, seguiram-se os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), com aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UNIT/ Aracaju/SE, cujo número do Parecer Consubstanciado foi 191208 para a própolis verde e 181208 para própolis vermelha. O estudo foi realizado no Biotério e no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), na Universidade Tiradentes (UNIT/SE).

2.1 Coletas da própolis

A coleta de própolis verde foi realizada no apiário da cidade de Montes Claros/MG e a própolis vermelha foi coletada nos apiários localizados no Povoado de Brejão dos Negros, Município de Brejo Grande/SE, em caixas do tipo Langstrot previamente marcadas (figura 2). O material coletado foi etiquetado e acondicionado em vasilhames estéreis, sob refrigeração e encaminhados ao Laboratório.



Figura 2. Coleta da Própolis Vermelha (a/b)– Caixa com coletor para própolis, caixas de Langstrot localizada no apiário do povoado Brejão dos Negros, Município Brejo Grande/SE. (c/d) Amostra de própolis coletada foi armazenada e enviada para o laboratório.



2.2 Obtenção do extrato de própolis

A extração da própolis verde foi realizada conforme a metodologia aplicada por PARK *et al.*, (1998). Foi usado 1 grama da amostra de própolis, passando por um processo de trituração e homogeneização e em seguida foram adicionados 100 mL de solução hidroalcoólica 70%. A extração foi feita em temperatura ambiente durante 24h sob agitação. Após a extração, a amostra foi filtrada e o solvente rotaevaporado. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido sob refrigeração.

Para a extração da própolis vermelha utilizou-se a metodologia conforme Maia-Araújo (2009). Foi utilizado 1 grama da amostra de própolis para 12,5 mL de etanol à 70%, colocado em tubo de ensaio estéril e em seguida levada ao aparelho de ultra-som (US) para extração durante 1 hora. Os extratos obtidos foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes deixados em capela de exaustão para completa evaporação do solvente e obtenção da massa. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido sob refrigeração.

O rendimento da extração foi calculado em relação à massa inicial de própolis utilizada e expressa em porcentagem (BRASIL, 2001).

2.3 Determinação de flavonóides totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada através do método descrito por Adelman (2005).

Para determinar o teor de flavonóides totais nas amostras, 0,5 mL dos extratos (concentração de 5 mg/mL) foram adicionados a uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10 % e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/litro. O volume final foi completado para 5 mL com etanol a 80%.

As amostras foram homogeneizadas e após 40 minutos, em temperatura ambiente, a absorvância foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda 415 nm. Para elaboração da curva de concentração padrão foi utilizada a quercetina nas concentrações de 5 a 50 µg/mL dissolvida em etanol e os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes de quercetina (mg de quercetina em 100 mg de sólidos totais).



2.4 Ensaio Biológico

Um total de 54 ratos *Wistar*, machos adultos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximadamente 350 ± 50 g foram divididos em 09 grupos, conforme descrito no quadro 1:

Quadro 1. Distribuição dos grupos experimentais.

GRUPOS	PRODUTO PINCELADO EM LÍNGUA DE RATO	PRODUTO ADMINISTRADO POR GAVAGEM
CTR1	Água destilada	Água Destilada 1 mL + 2 gotas de tween 80 a 2%
CTR2	Água destilada	Extrato hidroalcoólico de própolis verde 300 mg/kg
CTR3	Água destilada	Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg
TUM1	DMBA a 0,5 %	Água Destilada 3 mL
TUM2	DMBA a 0,5 %	Tween 80 a 2% 3 mL
PROP1	DMBA a 0,5 %	Extrato hidroalcoólico de própolis verde 100 mg/kg
PROP2	DMBA a 0,5 %	Extrato hidroalcoólico de própolis verde a 200 mg/kg
PROP3	DMBA a 0,5 %	Extrato hidroalcoólico de própolis verde 300 mg/kg
PROP4	DMBA a 0,5 %	Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg

2.5 Acondicionamento dos animais

Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h e água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). Após atingir a massa corporal supracitado, os animais foram submetidos aos procedimentos de indução de carcinogênese química experimental no Biotério da UNIT/SE.



2.6 Procedimento de indução de carcinogênese química

As lesões orais foram induzidas no terço médio do dorso da língua de ratos dos grupos TUM1, TUM2, PROP1, PROP2, PROP3, PROP4; através da aplicação tópica de 9,10 dimetil 1,2-benzantraceno (DMBA), obtido na forma de pó e diluído a 0,5% em acetona. Os demais grupos (CTR1, CTR2 e CTR3) não receberam a carcinogênese induzida, pincelando apenas água destilada na língua dos animais funcionando como controle negativo. O DMBA e a água destilada foram pincelados no dorso da língua dos ratos 2 vezes (pincel pelo de Marta, Nº 0) em dias alternados (terça, quinta e sábado), 3 vezes por semana, durante 20 semanas (KAVITHA E MANOHARAN, 2006) (figura 3). Após o procedimento de indução, os animais foram colocados em regime de suspensão de dieta e água por trinta minutos; após esse período, ração e água eram liberados *ad libitum*.

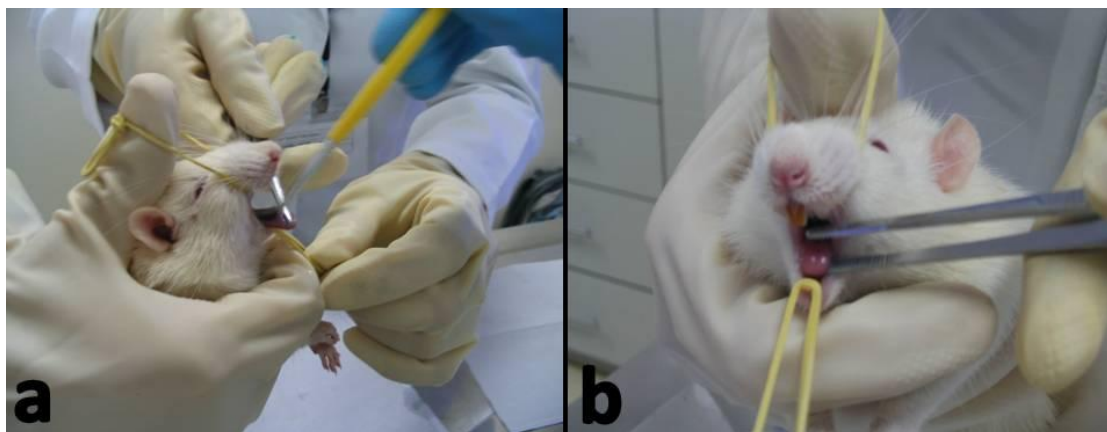


Figura 3. Procedimento de indução da carcinogênese experimental. (a) Procedimentos de pincelamento do DMBA no dorso lingual de rato *Wistar*. (b) Detalhe do método de retração da língua para exposição adequada do dorso lingual.

2.7 Administração da Gavagem

Para administração do extrato, o extrato seco foi ressuscitado em Tween 80 a 2% na concentração de 10 mg/mL.

Os animais dos grupos PROP1, PROP2, PROP3 foram tratados com administração oral (gavagem) de extrato hidroalcoólico de própolis verde 100; 200 e 300 mg/Kg e o PROP4 com extrato hidroalcoólico da própolis vermelha 100mg/Kg. Os animais do grupo CTR1 receberam por gavagem água destilada 1 mL + 2 gotas de tween 80 a 2%, o grupo CTR2 recebeu extrato hidroalcoólico de própolis verde 300 mg/kg e o grupo CTR3 recebeu extrato hidroalcoólico de própolis vermelha a 100 mg/kg. Os grupos TUM1 e TUM2



receberam Água Destilada 3 mL e 3 mL de tween 80 a 2%, respectivamente (controle positivo/com DMBA).

A administração oral destas substâncias (figura 4) foi realizada em dias alternados (diferindo dos dias de aplicação do DMBA), ou seja, na segunda, quarta e sexta feira, onde antes da indução da carcinogênese foi feita uma semana de gavagem de reforço do produto natural utilizado, estendendo-se por 20 semanas (KAVITHA E MANOHARAN, 2006).

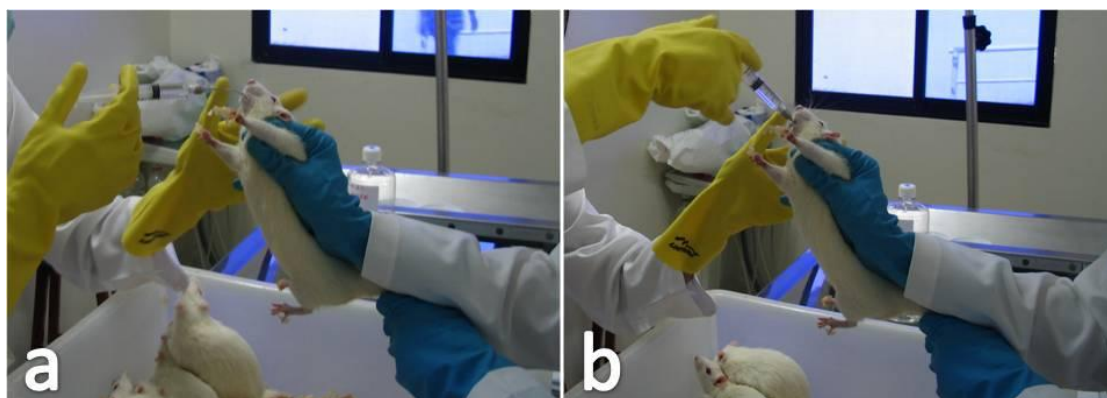


Figura 4. Procedimento de gavagem. (a) Posicionamento da seringa com cânula de gavagem para ratos. (b) Procedimento de administração de água (CTR1) com o mesmo aparato.

2.8 Procedimento de análise histomorfológica dos espécimes

Decorridas as 20 semanas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, para que a área pincelada fosse submetida à remoção *post-mortem*. Os espécimes teciduais foram fixados em formol tamponado (10%, pH 7,4) por 24 h, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico e diafanizados em xilol, para posterior inclusão em parafina. Foram obtidas secções histológicas de 5µm de espessura, e estas submetidas à coloração de rotina pela Hematoxilina/Eosina, sendo os espécimes examinados ao microscópio de luz (Microscópio Óptico Olympus CX31) por três observadores previamente calibrados.

As lesões foram classificadas conforme os sistemas de gradação histológica propostos pela Organização Mundial da Saúde (BARNES *et al.*, 2005), e pelo método proposto por Kujan *et al.*, (2006), denominado de Sistema Binário. Foram avaliadas as seguintes alterações arquiteturais e citológicas: **1) Arquiteturais:** estratificação epitelial irregular; perda da polaridade das células da camada basal; projeções epiteliais em forma de gota; aumento do número de figuras de mitose; presença de figuras de mitose anormais na metade superior do epitélio (mitoses altas); queratinização prematura em células isoladas e pérolas de queratina em projeções epiteliais; **2) Citológicas:** variação anormal de



tamanho do núcleo; pleomorfismo nuclear; variação anormal de tamanho da célula; pleomorfismo celular; proporção núcleo/citoplasma aumentada; aumento no tamanho do núcleo; figuras de mitoses anormais; número e tamanho de nucléolos aumentados; hiperchromatismo nuclear. De acordo com a OMS (BARNES *et al.*, 2005), as alterações foram classificadas em: displasia leve, quando as alterações supracitadas restringem-se ao terço inferior do epitélio (camadas basais e parabasais); displasia moderada, quando tais alterações atingem o terço médio do epitélio (porção média da camada espinhosa) e displasia grave, quando as alterações arquiteturais e citológicas ultrapassam o terço médio do epitélio. Conforme o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006), as alterações epiteliais categorizadas em: 1) lesões de alto risco: presença de 4 ou mais alterações arquiteturais e/ou 5 ou mais alterações citológicas, e 2) lesões de baixo risco: presença de menos de 4 alterações arquiteturais e menos de 5 alterações citológicas.

2.9 Análise Estatística

O cálculo das médias das alterações foi obtido a partir da análise das características de atipia epitelial e foram comparados entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA), seguido por pelo teste *post-hoc* de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando o valor de *p* fosse menor que 0,05.



RESULTADOS



3. RESULTADOS

O rendimento de ambos os extratos secos das amostras verde e vermelha de própolis foi em torno de 42%. Além disso, a amostra utilizada da própolis verde apresentou um bom teor de flavonóides e para a variedade vermelha apresentou baixo teor (tabela 1).

Tabela 1. Determinação do rendimento e teor de flavonóides nas amostras de própolis verde e vermelha.

	Massa inicial (g)	Massa obtida após extração (g)	Rendimento Final (%)	Teor de flavonóides (%±DP)
Própolis verde	14,17	5,87	41,43	0,95±0,44
Própolis vermelha	56,71	24,26	42,78	0,13±0,11

Os dados referentes à análise histopatológica do revestimento epitelial lingual dos animais estão sintetizados na tabela 2.

Os grupos CTR1 (figura 5a) e CTR2 (figura 5b) exibiram os mais baixos números de alterações morfo-arquiteturais (1.5 ± 0.22 e 1.75 ± 1.50 , respectivamente) que, quando presentes, estavam representadas por áreas focais de duplicação da camada basal e discreto estrangulamento e hiperplasia de papilas epiteliais. Não foi evidenciada atipia citológica. No grupo CTR3 (figura 6), alterações arquiteturais como aumento do tamanho das papilas e hiperplasia basilar; e citológicas, como hiper Cromatismo e tamanho celular aumentado foram observados. Contudo, tais alterações epiteliais foram classificadas como de baixo risco pelo Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006) e como modificações morfológicas não displásicas de acordo com os critérios preconizados pela OMS (BARNES *et al.*, 2005).



Tabela 2. Análise dos escores médios das alterações histológicas epiteliais e classificação de acordo com a OMS e Sistema Binário.

GRUPOS	Alterações Histológicas Epiteliais			Classificação das Alterações Epiteliais	
	Arquiteturais (Média±DP)	Citológicas (Média ±DP)	Estratos Epiteliais Atingidos	Sistema Binário	Sistema OMS
CTR1	1.5 ±0.22 a	0 a	Basal	BR	ND
CTR2	1.75 ±1.50 a	0 a	Basal	BR	ND
CTR3	2.0 ±0.89 a	0.66 ±0.81 a	Basal	BR	ND
TUM1	4.83 ±0.40 b	2.33 ±1.36 b	Espinhoso Médio	AR	DM
TUM2	4.50 ±1.51 b	3.16 ±2.13 b	Espinhoso Médio	AR	DM
PROP1	4.0 ±1.22 b	0.80 ±0.30 a	Basal/Parabasal	AR	DL
PROP2	2.66 ±1.03 a	0.33 ±0.51 a	Basal/Parabasal	BR	DL*
PROP3	2.0 ±0.63 a	0.50 ±0.22 a	Basal/Parabasal	BR	DL*
PROP4	2.33 ±1.03a	0.83±1.60 a,b	Basal/Parabasal	BR	DL

DP – desvio-padrão.

Epitélio com alterações não displásicas (ND); Displasia Leve (DL); Displasia Moderada (DM); Displasia Intensa (DI); Baixo Risco (BR); Alto Risco (AR); (*) Apenas em áreas focais. Letras distintas na mesma coluna representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

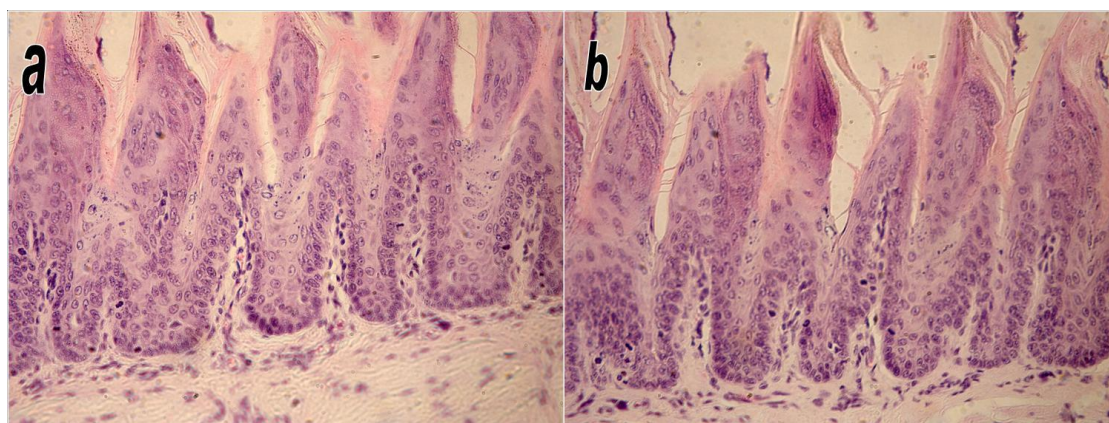


Figura 5. Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais dos grupos CTR1 (a) e CTR2 (b) exibindo características usuais. Notar cristas epiteliais altas, hiperqueratinizadas e papilas longas, de base romba. (HE, 200x).

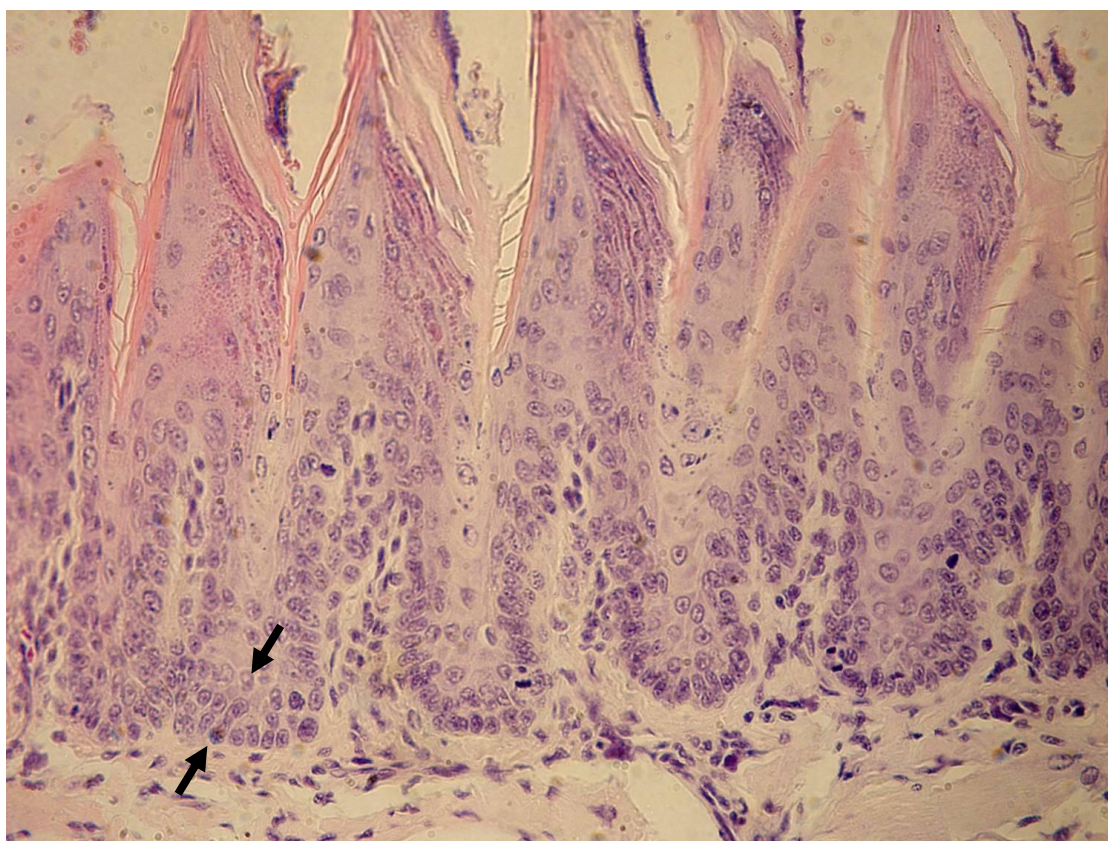


Figura 6. Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo CTR3 exibindo discretas alterações arquiteturais, como hiperplasia basilar focal (setas). (HE, 200x).

Os grupos TUM1 (figuras 7 e 8) e TUM2 (figura 9) exibiram os mais altos quantitativos de alterações morfo-arquiteturais ($4,83 \pm 0,40$ e $4,50 \pm 1,51$, respectivamente) e citológicas ($2,33 \pm 1,36$ e $3,16 \pm 2,13$, respectivamente). As alterações morfo-arquiteturais estavam representadas por hiperplasia basilar, projeções papilares estranguladas (em forma de gota), aumento do número de figuras mitóticas (duas ou mais em cada campo histológico em magnificação de 200x), algumas delas em estratos epiteliais altos, e disceratose. Já as citológicas consistiram de núcleos celulares exibindo hipercromatismo e discreto a moderado pleomorfismo, além de ocasional aumento da relação núcleo/citoplasma. Tais alterações citomorfológicas, apesar de se distribuírem ao longo do revestimento epitelial, se limitavam aos estratos basal, parabasal e espinhoso médio. As alterações epiteliais foram



classificadas como de alto risco de acordo com o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006) e como displasias moderadas conforme preconizado pela OMS (BARNES *et al.*, 2005).

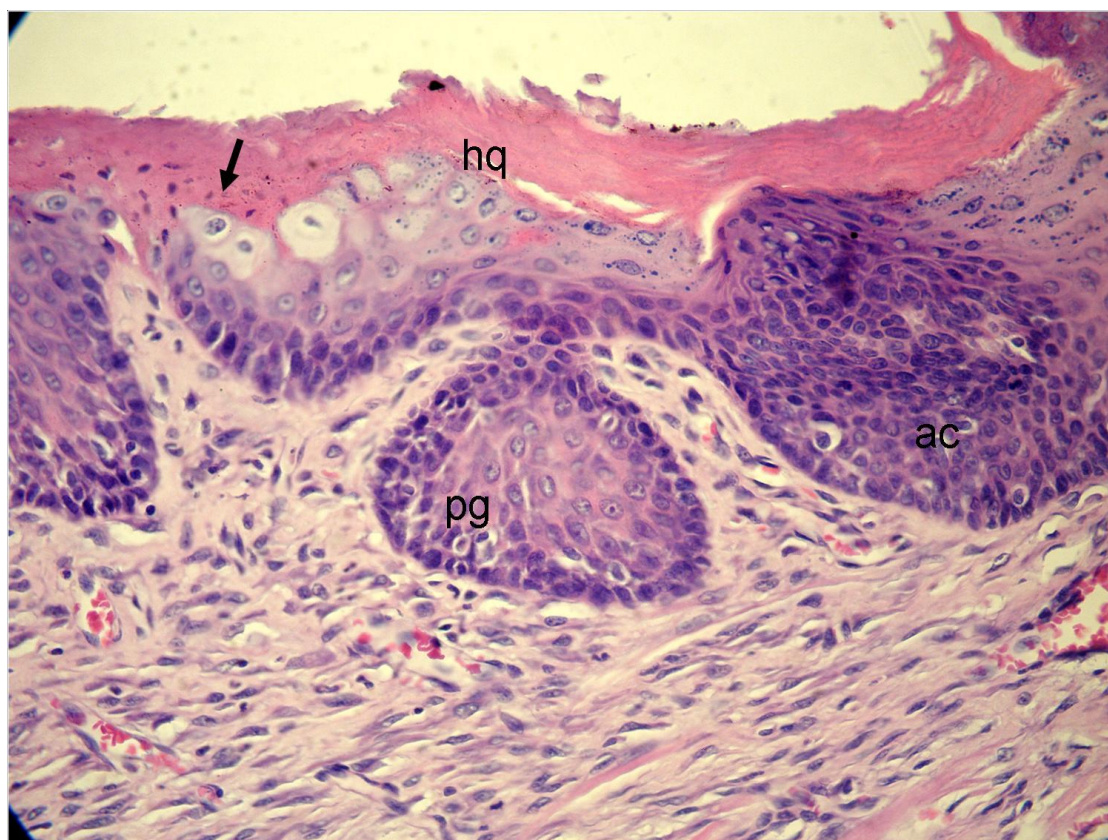


Figura 7. Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo TUM1 exibindo extensas alterações citoarquiteturais. Note a formação de papilas intensamente estranguladas em forma de gota (pg), áreas de proeminente apinhamento de células com núcleos hipercromáticos de aspecto basalóide (ac) e pecilocarínose no estrato espinhoso alto (seta). A superfície epitelial perdeu sua organização em papilas e se mostra hiperqueratinizada (hq) (HE, 200x).

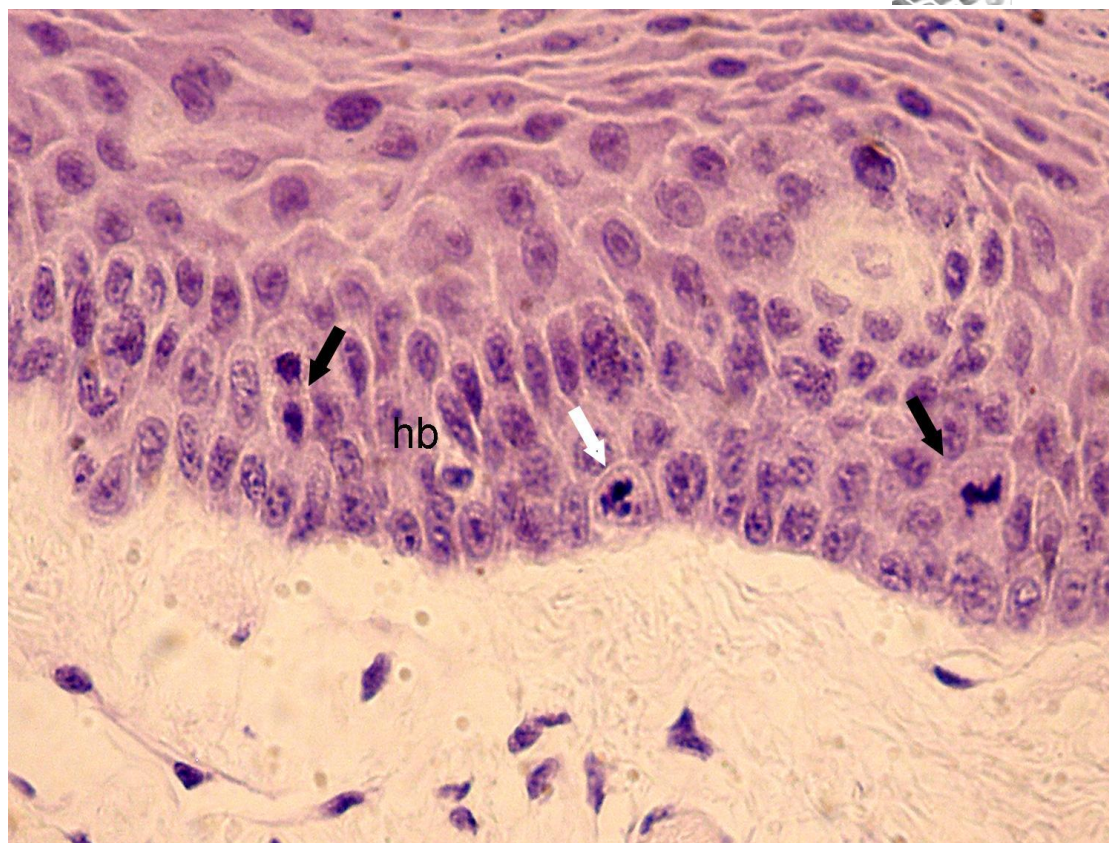


Figura 8. Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo TUM1 exibindo patente duplicação da camada basal ou hiperplasia basilar (hb), mitoses no estrato epitelial espinhoso médio (setas escuras) e mitose atípica (tripolar) na camada basal (seta clara) (HE, 400x).

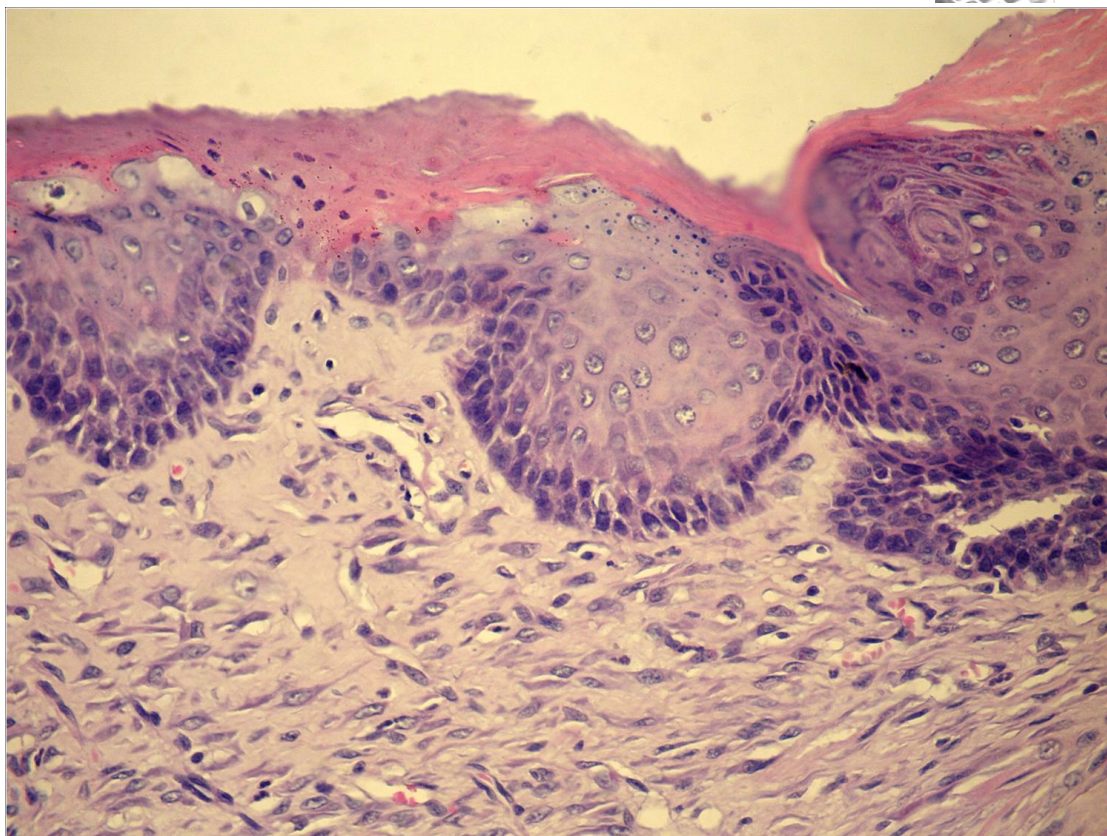


Figura 9. Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo TUM2 exibindo extensas alterações citoarquiteturais similares àquelas observadas no grupo TUM 1 (HE, 200x).

O grupo PROP1 (figura 10) exibiu elevado número médio de alterações morfo-arquiteturais (4.0 ± 1.22), mas baixo número de citológicas (0.80 ± 0.30). As alterações morfo-arquiteturais observadas foram similares àquelas evidenciadas em TUM1 e TUM2, embora limitadas ao terço inferior do tecido epitelial (basal/parabasal), enquanto que as citológicas foram representadas apenas por discreto hiperchromatismo de células basais e parabasais. As alterações epiteliais foram classificadas como de alto risco de acordo com o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006) e como displasias leves conforme preconizado pela OMS (BARNES *et al.*, 2005).

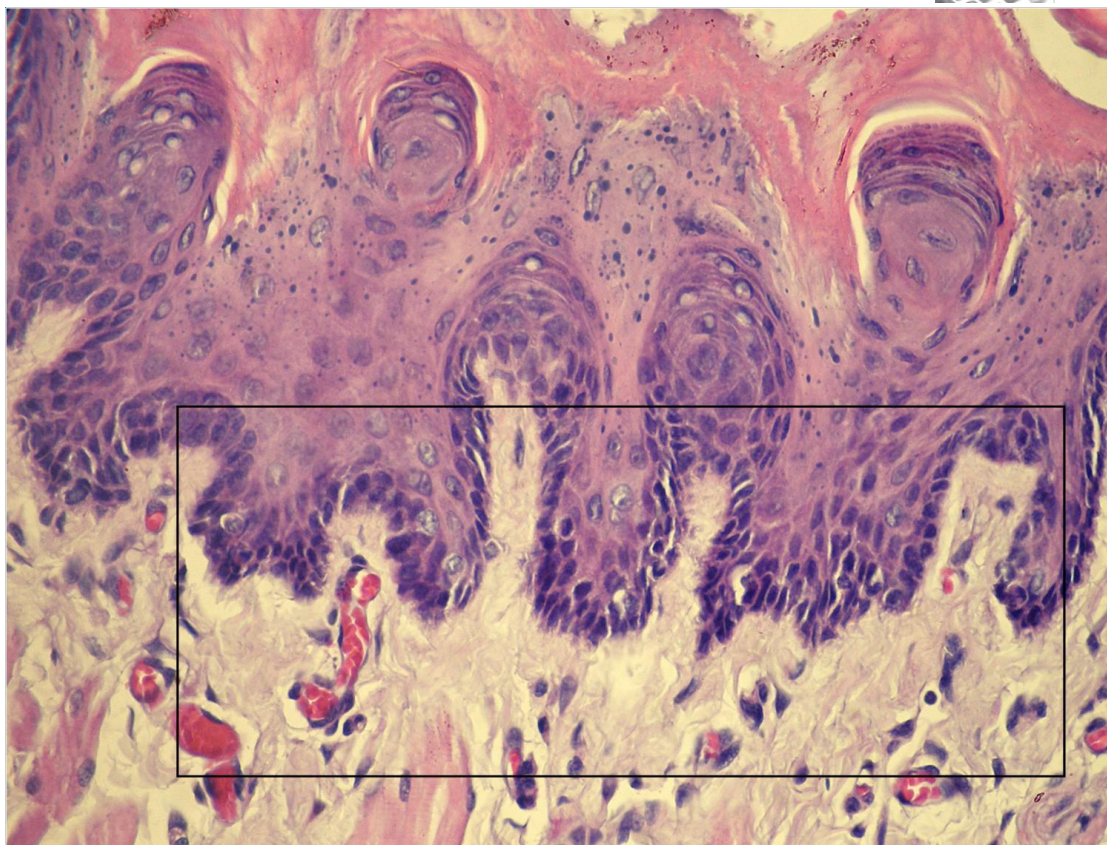


Figura 10. Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo PROP1 exibindo pleomorfismo e hiper cromatismo no terço inferior epitelial, com destaque para a formação de papilas estranguladas em forma de gota (HE, 200x).

Os grupos PROP2, PROP3 e PROP4 (figura 11) exibiram comportamentos semelhantes, apresentando números baixos de alterações tanto morfo-arquiteturais ($2,66 \pm 1,03$, $2,0 \pm 0,63$ e $2,33 \pm 1,03$, respectivamente) quanto citológicas ($0,33 \pm 0,51$, $0,50 \pm 0,22$ e $0,83 \pm 1,6$, respectivamente). Estrangulamento de papilas (projeções em gota), hiperplasia basilar e aumento do número de mitoses foram as alterações morfo-estruturais observadas, enquanto que, quando presentes, as alterações citológicas estavam representadas por discreto aumento no tamanho dos núcleos basais e parabasais. As poucas alterações observadas estavam sempre limitadas ao estrato basal/parabasal, e dispostas apenas em áreas bastante focais. Estas foram, portanto, classificadas como de baixo risco de acordo



com o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006) e como displasias leves conforme preconizado pela OMS (BARNES *et al.*, 2005).

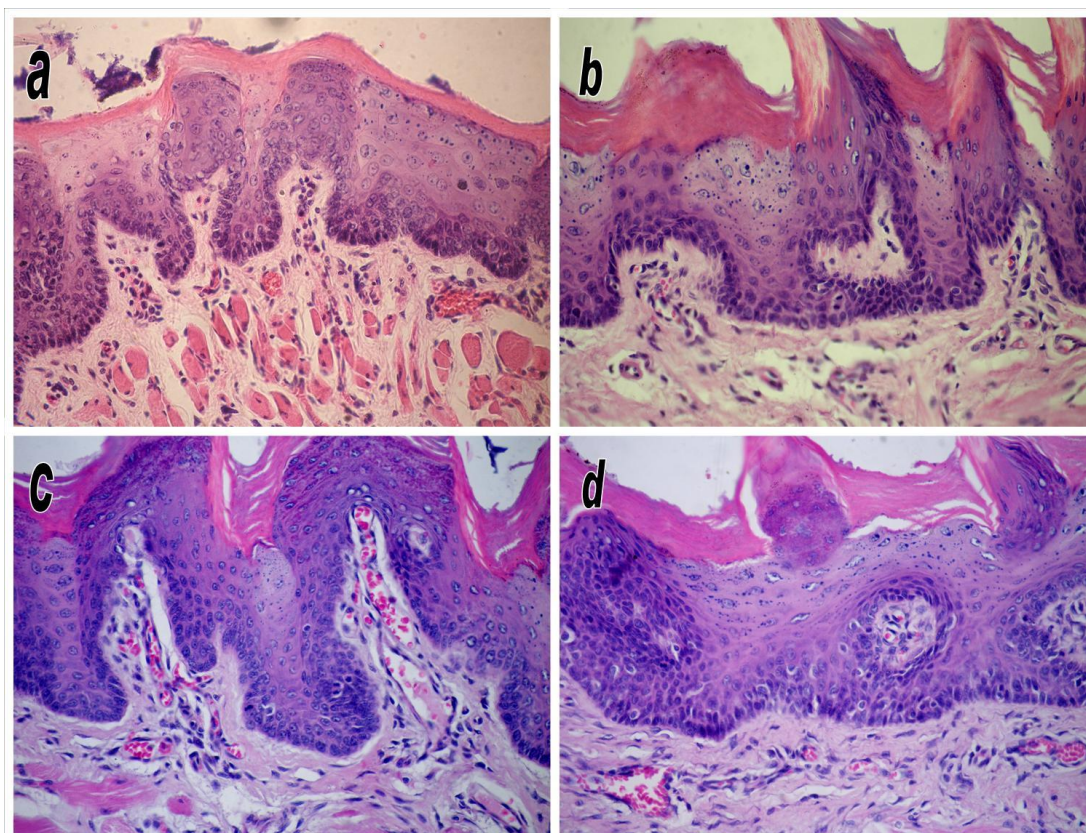


Figura 11. Secções histológicas coradas em HE do dorso lingual dos animais do grupo PROP2 (a), PROP3 (b) e PROP4 (c/d). Observe desarranjo arquitetural das camadas epiteliais inferiores, apinhamento de células basalóides e áreas de acantose. Individualmente, muitos núcleos de células parabasais se mostram hipercromáticos e levemente pleomórficos. (HE, 200x).

Após análise estatística, foi observado que os grupos TUM1, TUM2 e PROP1 exibiram número médio de alterações morfo-arquiteturais estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$), mas todos significativamente maiores que aquele evidenciado em CTR1, CTR2 e CTR3 ($p < 0,01$), e em PROP2, PROP3 e PROP4 ($p < 0,05$). Além disso, estes últimos grupos também não foram diferentes entre si ($p > 0,05$). Quanto às alterações citológicas, os grupos TUM1 e TUM2, apesar de semelhantes entre si ($p > 0,05$), apresentaram valores significativamente mais elevados que os demais ($p < 0,01$), exceto para PROP 4 ($p > 0,05$).



DISCUSSÃO



4. DISCUSSÃO

O processo de carcinogênese química apresenta vários estágios incluindo a iniciação, a promoção e a progressão do tumor. Assim, o alvo de muitas pesquisas tem sido a descoberta de compostos naturais ou sintéticos que possam prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (ORSOLIC *et al.*, 2005). Estudos são realizados no sentido de testar o efeito quimioterápico de produtos naturais, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento das neoplasias malignas, utilizando metodologias *in vitro* (LUO *et al.*, 2001) e modelos experimentais de indução de carcinogênese química em roedores (KAVITHA; MANOHARAN, 2006).

A busca por novas drogas de origem vegetal têm impulsionado alguns fatores acerca da descoberta de novos compostos eficazes para produção de fármacos no combate ao câncer. Alguns estudos mostram a importância da biodiversidade das plantas no Brasil, desta maneira a produção de fármacos de fonte vegetal poderia talvez viabilizar o acesso da maioria da população aos medicamentos modernos e fazer com que vias alternativas mais baratas sejam oferecidas. Com isso, a busca por novas terapias antitumorais aumenta a cada ano (CARVALHO, 2006).

Neste estudo, para a indução das lesões, foi utilizado um carcinógeno químico, denominado 9,10-dimetil-1,2-benzatraceno (DMBA), que vem sendo amplamente empregado em estudos de indução de carcinogênese química, conforme apontam os trabalhos de Lima, Taveira *et al.*, (1999); Chen, Hsue e Lin, (2003); Barros *et al.*, (2004); Wang *et al.*, (2008). A escolha da língua como sítio anatômico para o desenvolvimento das lesões, fundamenta-se na elevada incidência do CEO nesta região, bem como no comportamento biológico agressivo deste tipo específico de carcinoma epidermóide, devido à extensa vascularização da língua entre outros fatores anatômicos, em consonância com (BSOUL *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2008; INCA, 2009).

A utilização da própolis neste estudo justifica-se pelo amplo espectro de propriedades biológicas deste apiterápico. Neste sentido, pesquisas recentes têm demonstrado que a própolis apresenta atividade antitumoral contra linhagens celulares de tumores pancreáticos (LI *et al.*, 2010), gliais (LIN *et al.*, 2010), prostáticos (SZLISZKA *et al.*, 2009) e laríngeos (BUFALO *et al.*, 2009). Apesar de ser constituída por uma ampla e variável gama de compostos químicos, os flavonóides tem sido descritos como os principais responsáveis por esta atividade biológica da própolis (SHA *et al.*, 2009).



Os flavonóides são compostos fenólicos, que contêm um radical hidroxila ligado diretamente a um anel aromático, podendo apresentar ação antibacteriana, pois têm capacidade de inibir a RNA-polimerase bacteriana; ou atuarem como imunomoduladores, antioxidantes e cicatrizantes, devido à capacidade de seqüestrar ou inibir a formação de radicais livres (BOSIO *et al.*, 2000; ADELMANN, 2005), o que vem sugerir que estes fitocompostos possam atuar modificando ou interrompendo a síntese protéica, um evento metabólico fundamental para manutenção da viabilidade celular. Corroborando estes achados, estudos têm demonstrado que determinados flavonóides apresentam potente atividade citolítica *in vitro* (MARDER *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Blank *et al.*, (2004) mostraram que diversos flavonóides exibem atividade antiproliferativa sobre linhagens celulares derivadas do carcinoma cervical humano (WISH cells). Além disso, Cárdenas *et al.*, (2006) verificaram que esta classe de compostos fitoquímicos promoveram bloqueio na atividade proliferativa *in vitro* contra linhagens de células tumorais humanas derivadas de adenocarcinoma cervical (HeLa) e mamário (MCF), carcinoma orofaríngeo (KB) e melanoma (SK-MEL-28), bem como linhagens murinas derivadas de adenocarcinoma mamário (F3II) e pulmonar (LP07) e melanoma (B16-F0). Contudo, nenhum dos compostos testados modificou o padrão de proliferação de células epiteliais derivadas da glândula mamária normal ou de fibroblastos embrionários de ratos, sugerindo uma atividade antiproliferativa seletiva contra células com fenótipo tumoral. Corroborando esta teoria, Parajuli *et al.*, (2009) também demonstraram que alguns flavonóides são capazes de interromper o ciclo celular em linhagens celulares derivadas de gliomas (U87-MG), mas não afetaram a atividade proliferativa de culturas primária de astrócitos humanos normais (NHA).

Neste estudo, a amostra utilizada da própolis verde apresentou um bom teor de flavonóides, já que, conforme preconizado pela Legislação de Compostos Flavonóides (BRASIL, 2001), o teor mínimo é de 0,25% (m/m). A amostra de própolis vermelha, por outro lado, apresentou baixos teores destes compostos. Além disso, o rendimento dos extratos secos foi acima do valor mínimo especificado pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), (11% m/v), sendo, portanto, considerado plenamente satisfatório.

Neste trabalho observou-se nos grupos de controle negativo, CTR1, CTR2 e CTR3 a presença de mucosa oral com aspecto de normalidade, com escassas alterações morfo-estruturais, expressas por áreas focais de duplicação da camada basal e formação de papilas irregulares. Segundo Neville *et al.* (2003); Regezi, Sciuba e Jordan (2008), é comum observar alterações arquiteturais e citológicas em áreas da cavidade oral submetidas a atrito



constante, como é o caso do dorso da língua, que constitui área de mucosa mastigatória. Estas seriam, portanto, interpretadas como distúrbios de natureza reacional trauma induzidos, e não devem ser confundidas com alterações de caráter displásico.

Nos grupos controle positivos, TUM1 e TUM2, verificou-se grande quantidade de alterações morfológicas arquiteturais e citológicas, que se estendiam até o terço médio epitelial. Estes achados são favoráveis ao potencial carcinogênico atribuído ao DMBA, conforme sugeriram Lima e Taveira *et al.*, (1999); Chen, Hsue e Lin, (2003); Barros *et al.*, (2004); Wang *et al.*, (2008). É importante destacar, que fatores endógenos, como a localização do tumor a ser induzido, a espécie ou linhagem do animal e a condição de saúde do mesmo; bem como fatores exógenos, como tipo de alimentação e condicionamento dos animais, e, sobretudo a concentração, o veículo de diluição e a forma de administração do DMBA, podem provocar variações no período de tempo necessário para a indução de tumores malignos, através da carcinogênese química. Tais aspectos justificam o fato de que uma ampla variedade de tempo de indução de carcinogênese tem sido relatada na literatura, com resultados que vão desde displasias (ALLEN *et al.*, 1990) a carcinomas epidermóides invasivos (KAVITHA; MANOHARA, 2000).

Nos grupos experimentais, PROP1, PROP2, PROP3 e PROP4, observaram-se áreas de atipia morfológica limitadas aos terços epiteliais inferiores. Esta atipia teve distribuição difusa na mucosa oral do grupo PROP1, embora nos grupos PROP2, PROP3 e PROP4, tenha sido evidenciada distribuição focal no epitélio de revestimento lingual. Estes dados parecem sugerir que a administração dos extratos hidroalcoólicos da própolis promoveu uma melhoria no quadro epitelial displásico induzido por carcinogênese química, e que esta atividade quimioprotetora poderia estar relacionada à concentração de própolis utilizada. Tais achados parecem confirmar a propriedade antitumoral deste apiterápico, estando em conformidade com relatos prévios de Luo *et al.*, (2007); Orsolic *et al.*, (2004); Khalil, (2006).

Segundo Veronez (2000), um dos principais flavonóides responsáveis pela atividade antitumoral da própolis verde é o Éster fenetil do Ácido Caféico (CAPE), que tem demonstrado ação citotóxica sobre células tumorais, além de inibição dos processos oxidativos essenciais para a geração de tumores, supressão da destruição oxidativa de leucócitos e inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em células tumorais. É importante destacar, que nos grupos PROP2 e PROP3, não se observaram mitoses atípicas ou mitose em estratos epiteliais basais e parabasais, achados histológicos que corroboram a ação mitodepressora deste apiterápico.



Derivados do CAPE também foram estudados em câncer oral usando linhagens de carcinoma epidermóide OECM1 e de fibroblastos humanos normais (NHOF), a partir da investigação de seus efeitos sobre o padrão de crescimento celular e alterações no ciclo celular. O CAPE mostrou-se citotóxico para a linhagem OECM1, mas não teve ação sobre a linhagem NHOF, além de impedir a passagem das células tumorais em cultura para a fase G2/M do ciclo celular, sugerindo fortemente um efeito antitumoral seletivo sobre as linhagens celulares testadas (LEE *et al.*, 2005).

De acordo com Liao *et al.*, (2003), a utilização de CAPE aumentou a sobrevivência de camundongos onde foram implantados células de adenocarcinoma (linhagem CT26), reduzindo ainda o potencial de metástase pulmonar destas células. Além disso, também foi sugerido por Orsolic *et al.*, (2006) que o CAPE apresenta importante atividade imunomodulatória em modelo murino (camundongos), particularmente estimulando a ação da imunidade inespecífica via ativação macrófaga. Tal atividade biológica, então, culminaria no aumento da liberação de fatores solúveis por tais leucócitos, a exemplo do interferon γ (IFN- γ) e fator β de necrose tumoral (TNF- β), que afetariam diretamente a viabilidade de células tumorais ou ativaria outras células imunocompetentes citotóxicas, como os linfócitos T CD8+. A produção destas citocinas por macrófagos estimulados por compostos químicos derivados da própolis também parecem atuar sobre células NK, aumentando sua atividade tumoricida (SFORCIN *et al.*, 2002). Células NK, assim como macrófagos, são células fundamentais na imunidade inata, mostrando atividade citotóxica para diversos tipos de tumores (BOYIADZIS *et al.*, 2006).

A relação entre a atividade antitumoral da própolis verde e a regulação da síntese de óxido nítrico (NO) também vem sendo estudada. Foi relatado por Orsi *et al.*, (2000) que extratos de própolis inibem a produção de NO por macrófagos estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos ou IFN- γ , dependendo da dose. Segundo Araújo *et al.*, (2010), a produção de NO em tumores sólidos experimentais pode facilitar a permeabilidade vascular e o rápido crescimento do tumor, enquanto uma baixa produção deste metabólito pode causar um efeito oposto.

O mecanismo de modulação da carcinogênese promovida pelo extrato hidroalcoólico da própolis vermelha ainda é desconhecido, mas poderia estar relacionada às particularidades de sua composição química. Estudos realizados por Mendonça (2010), com amostras mensais da própolis vermelha sergipana, similar àquela utilizada neste trabalho, indicaram que o isoflavonóide formononetina parece representar o principal marcador químico deste produto apícola, com potente atividade antioxidante (YU *et al.*,



2007), antibacteriana (YANG *et al.*, 2008), antifúngica (NOVAIS; SIQUEIRA, 2009), antiparasitária (LAWAET *et al.*, 2010). Este flavonóide também foi identificado em outras amostras de própolis vermelha, conforme descrito previamente por Dausch (2007).

Embora não existam relatos de atividade antitumoral determinada pela formononetina, tem sido reportado que, quando consumida por mamíferos, este fitocomposto é metabolizado em daidzeína, um isoflavonóide aglicona abundante na soja, que vem sendo utilizado na prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa (DAUGSCH *et al.*, 2006). Além disso, estudos têm demonstrado que a daidzeína apresenta atividade antitumoral contra linhagens celulares MCF-7 derivadas de câncer mamário (JIANG *et al.*, 2010) e carcinomas ovarianos (APPEL *et al.*, 2010).

Os efeitos citotóxicos antitumorais da daidzeína ainda podem estar relacionados à inibição de enzimas como a topoisomerase II (SKIBOLA; SMITH, 2000). As isoflavonas ainda interferem na ação da DNA-topoisomerase II, S6-quinase ribossomal, fosfoinositídio 3-quinase (PI 3-quinase) e proteína quinase C (PKC), enzimas ligadas ao ciclo, diferenciação e proliferação celulares (AGUIAR, 2002). A atividade citotóxica deste isoflavonóide poderia ainda ser atribuída a grupos quinona presentes na sua estrutura química, que seriam responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio (OIKAWA *et al.*, 2003).

Também foi relatado que a daidzeína impede a transformação neoplásica de células epiteliais murinas JB6 P+ promovendo apoptose das células transformadas (KANG *et al.*, 2007). Nesse sentido, estudos efetuados com cultura de células tumorais mamárias (MCF-7) indicam que a daidzeína pode promover desequilíbrio no potencial transmembrana mitocondrial, associada a inibição da transcrição do gene bcl-2 e estimulação do gene bax, conduzindo, por consequência, a liberação do citocromo C mitocondrial para o ambiente citosólico. Esse fenômeno culminaria na ativação de caspases e conduziria a células tumorais à morte por apoptose (JIN *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos realizados por Hirota *et al.*, (2010) mostraram que isoflavonóides agliconas, como a daidzeína, estimularam a apoptose e a lipogênese em linhagens celulares pré-adipocíticas AML-I, sugerindo que estes compostos químicos também parecem influenciar o processo de diferenciação de células embrionária *in vitro*.

Um ponto importante a ser discutido é que, apesar de a formononetina, flavonóide precursor da daidzeína, aparentemente representar um marcador químico da própolis vermelha sergipana, o EHPP utilizado neste experimento apresentou baixos teores de flavonóides. Contudo, estudos anteriores demonstraram a atividade cicatrizante



(ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009) e gastroprotetora (PINHEIRO, 2009) do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha sergipana. Esses relatos parecem sugerir que os flavonóides evidenciados nesta variedade da própolis vermelha, mesmo em quantidades mínimas, poderiam apresentar atividade biológica significativa.

Outra provável justificativa para os baixos teores de flavonóides na própolis vermelha obtidos no presente estudo pode ser observada nos estudos de Nunes *et al.*, (2009). Estes autores identificaram por meio de cromatografia em camada delgada de amostras sazonais de própolis vermelha pernambucana os flavonóides como compostos químicos majoritários, embora a quercetina não tenha sido detectada, mesmo sendo reportado na literatura em outras própolis (PIETRA *et al.*, 2002; SALATINO *et al.*, 2005). Tais relatos são de extrema importância ao considerar que o padrão utilizado para dosagem de flavonóides neste trabalho foi a quercetina, o que poderia justificar os baixos teores encontrados na amostra sergipana de própolis vermelha. Adicionalmente, Yanez *et al.*, (2004) comenta que outros compostos já descritos na própolis, como os ácidos fenólicos e seus derivados poderiam tanto ser os responsáveis pela atividade biológica, como agirem sinergicamente com os flavonóides. Desta maneira, é fundamental a realização de outros estudos no intuito de elucidar esta questão.

Ainda deve ser destacado que, corroborando relatos anteriores descritos por Búfalo *et al.*, (2009), o solvente utilizado para solubilizar ambos os extratos secos da própolis não apresentaram efeitos substanciais na morfologia ou arquitetura dos tecidos epiteliais, sugerindo que a ação quimiopreventiva observada neste estudo ocorreu exclusivamente em função dos componentes químicos presentes no apiterápico.

Com relação aos sistemas de gradação histológica das displasias epiteliais da mucosa oral, chama-se a atenção que no grupo PROP1 houve divergência entre a classificação da OMS (BARNES *et al.*, 2005) e o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006), já que algumas das lesões foram classificadas como displasia leve e lesão displásica de alto risco, respectivamente. Adicionalmente, a análise estatística mostrou que, de acordo com a classificação proposta pelo Sistema Binário preconizado por Kujan *et al.*, (2006), não houve diferença significativa entre os grupos controles positivos (TUM1 e TUM2) e o grupo tratado com a menor concentração de própolis verde (PROP1). Este fato parece sugerir uma maior praticidade para a classificação OMS (BARNES *et al.*, 2005) pois considera a ocorrência das alterações arquiteturais e citológicas ao longo de toda a extensão da mucosa oral, enquanto que o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006), por considerar apenas a quantidade de alterações arquiteturais e citológicas presentes durante a análise histopatológica,



desprezando o nível de comprometimento da mucosa oral pelas alterações displásicas, parece tender a superestimar a gradação das alterações citomorfológicas. Estes dados também parecem sugerir que quando as alterações morfológicas e estruturais são abundantes, ambos os sistemas de gradação apontam resultados similares; contudo, quando são escassas ou focais, mais uma vez o Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006), tende a superestimar a gravidade da atipia citológica observada e conduzir a diagnósticos equivocados. Além disso, é relevante destacar a praticidade da classificação proposta pela OMS (BARNES *et al.*, 2005) quando comparada ao Sistema Binário (KUJAN *et al.*, 2006), que pressupõe uma análise mais detalhada e de utilidade duvidosa em rotinas laboratoriais.

Diante do exposto, os resultados desta pesquisa sugerem uma possível atividade quimiopreventiva e antitumoral de ambas as variedades de própolis utilizada neste experimento. No entanto, estudos posteriores são demandados a fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação deste apiterápico sobre a carcinogênese bucal quimicamente induzida.



CONCLUSÕES



5. CONCLUSÕES

No presente estudo, o DMBA mostrou-se efetivo, na promoção da carcinogênese química, ao induzir alterações displásicas na mucosa oral. Sugere-se, ainda, que a própolis verde desempenha algum papel protetor durante o processo de carcinogênese quimicamente induzida em língua e que esta guardou relação direta com o aumento da sua concentração nos extratos hidroalcoólicos administrados por gavagem. Quanto aos sistemas de gradação histológica das displasias epiteliais da mucosa oral, observou-se que o proposto pela OMS mensurou de forma mais prática a severidade das displasias epiteliais, quando comparado ao Sistema Binário.



REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ADELMAN, J. **Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2005.
- AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 20, n.2, p. 323-334, 2002.
- ALBERT, B. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula.** Porto Alegre: Artmed Editora, 1. ed., p. 775, 2002.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, S. A. L.; PIRES, A. J; REIS, P. F.; LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A.; CARDOSO, C. J. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **Int. J. Morphol.**, v. 27, n.4, p.:1105-1110, 2009.
- ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMÁN, J.P.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural** v. 35, p. 909-915, 2005.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **J. Ethnopharmacol.** v.113, p. 278. 2007
- ALLEN, A. O.; ODUKOYA, O.; ASHIRU, O. A. Effect of oral contraceptive on early DMBA carcinogenesis of the rat palatal mucosa. **West Afr J Med.**v.9, n.1, p.:6-15, 1990.
- ALVES, A. P. N. N.; GUEDES, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. E. A.; PESSOA, C. O. ; FERREIRA, F. V. A.; MORAES, M. O. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 2561. **Acta Cir Bras** [serial online]; v. 19, n.4, Ago. 2004.
- APPEL, E.; RABINKOV, A.; NEEMAN, M.; KOHEN, F.; MIRELMAN, D. Conjugates of daidzein-alliinase as a targeted pro-drug enzyme system against ovarian carcinoma. **J Drug Target.** Aug 3. [Epub ahead of print], 2010.
- ASO, K.; KANNO, S.; TADANO, T.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory Effect of Propolis on the Growth of Human Leukemia U937. **Biol. Pharm. Bull.** v. 27, n.5, p. 727—730, 2004.
- AXÉLL, T. Treatment of smarting symptoms in the oral mucosa by appliance of lingual acrylic splints. **Swed Dent J.**, v. 32, n.4, p. 165-9, 2009.



BALASENTHIL, S. et al. Chemopreventive potential of neem (*Azadirachta indica*) on 7, 12-dimethyl[*a*]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **J Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 67, n. 2, p. 189-195, Feb. 1999.

BALUNAS, M. J. And Kinghorn, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants, **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. **Z Natuforsch.**, v. 54: p. 401-405, 1999.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y, PRASAIN, J.K., MATSUSHIGE, K., SAIKI, I., KADOTA, S. Chemical constituents of brazilian propolis and their citotoxic activities. **J. Nat. Prod.**, v.61, p.896-900, 1998.

BARNES, L.; EVENSON, J. W.; REICHART, P.; SINDRANSKY, D. **World Health Organization Classification of Tumours**. Pathology and genetics of head and neck tumours.; IARC Press: Lyon. 2005.

BARRET, J. M.; ERNOULD, A. P.; FERRY, G.; GENTON, A.; BOUTIN, J. A. Integrated system for the screening of the specificity of protein kinase inhibitors. **Biochem Pharmacol**. v. 3, n. 46(3), p. 439-48, Aug. 1993.

BARROS, A. C. S. D.; MURANAKA, E. N. K.; MORI, L. P.; PELIZON, C. H. T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J. A. Indução da carcinogênese mamária experimental em ratas com 7,12 – dimetil-benz(a) antraceno. **Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo**; 59(5): 257-261, 2004.

BIGNOLD, L. P. The cell-type-specificity of inherited predispositions to tumours: review and hypothesis. **Cancer Lett**. v. 28, n. 216, p.127-46. Review. Dec, 2004.

BIRNER, P.; BACHTIARY, B.; DREIER, B.; SCHINDL, M.; JOURA, E. A.; BREITENECKER, G.; OBERHUBER, G.; Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. **Mod Pathol**, v.14, n.7, p.702-709, Jul. 2001.



BLANK, V. C.; POLI, C.; MARDER, M.; ROGUIN, L. P. Antiproliferative activity of various flavonoids and related compounds: additive effect of interferon-alpha2b. **Bioorg Med Chem Lett.** v.14, n.1, p.133-6, 2004.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; HABIB JIWAN, J. L.; LLABRÈS, G.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1165-71, 2004.

BLOCK, S.; STÉVIGNY, C.; DE PAUW-GILLET, M. C.; DE HOFFMANN, E.; LLABRÈS, G.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. ent-trachyloban-3beta-ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. **Planta Med.**, v. 68, p. 647-9, 2002.

BOLANHO, A., CARMO, E. D. do.; SOUSA, F. A. C. G. de.; CARVALHO, Y. R.; ROSA, L. E. B. Descrição da metodologia utilizada no estudo da carcinogênese induzida pelo DMBA em língua de hamster. **Rev Odonto da UNESP**, v. 34, n. 3, p. 129-133, 2005.

BOONE, C. W.; YOU, M. Progress in cancer chemoprevention: agents. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, n. 6/7, 1997.

BORGES, L. V. **O efeito da talidomida sobre a carcinogênese cutânea experimental em camundongos BALB/c.** – Tese (Doutorado em Patologia), Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2009.

BOSIO, K.. In vivo activity of própolis against *Streptococcus pyogenes*. **Microbiology** v.31, p.174-77, 2000.

BOYIADZIS, M.; FOON, K.A.; HERBERMAN, R.B. NK cells in câncer immunotherapy: three decades of discovery. **Discov Med.** v. 6, p. 243-248, 2006.

BRAAKHUIS, B.J., et al. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Res**, v. 63, n. 8, p. 1727-30, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.** Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo – Patologia.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan., 7 ed, p. 1488, 2006.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. **Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular.** In: Brasileiro Filho G. Bogliolo: patologia. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 149-93. 2000.



BRENNAN, S. M.; SYRJANEN, K. J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. **Med J**; v. 121, p. 128- 32, São Paulo, 2003.

BSOUL, S. A.; HUBER, A. M.; TEREZHAIMY, G. T. Squamous Cell Carcinoma of the oral tissues: A comprehensive review for oral healthcare providers. **J Contemp Dent Pract**; 6:1-18, 2005.

BÚFALO, M. C.; CANDEIAS, J.M.G.; SFORCIN, J. M. In vitro Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells. **eCAM**; v. 6(4), p. 483–487, 2009.

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.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. de.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, Vol. 32, N. 6, 1523-1527, 2009.

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

CÁRDENAS, M.; MARDER, M.; BLANK V. C.; ROGUIN, L. P. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 14, p. 2966–2971, 2006.

CARVALHO, J. E. de. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Multiciência**, v.7, p. 1-18, 2006.

CARVALHO, M. B. et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. **Rev Assoc Med Bras**, v. 47, n. 3, p. 208-14, 2001.

CATALDO, E.; SHKLAR, G.; CHAUNCEY, H. H. Experimental submaxillary gland tumors in rats. **Arch Pathol.**, v. 77, p. 305-16, 1964.

CERVIGNE, N. K.; REIS, P. P.; MACHADO, J.; SADIKOVIC, B.; BRADLEY, G.; GALLONI, N. N.; PINTILIE, M.; JURISICA, I.; PEREZ-ORDONEZ, B.; GILBERT, R.; GULLANE, P.; IRISH, J.; KAMEL-REID, S. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. **Hum Mol Genet**. v. 18, n.24, p. 4818-29, 2009.

CESSATO, V. A. S. **Expressão dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2, bax, e caspase-3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral**. - Tese (Doutorado em Ciências), Programa



de Pós-Graduação em Ciências, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

CHAUDHARY, S. C.; ALAM, M. S.; SIDDIQUI, M. S.; ATHAR, M. Chemopreventive effect of farnesol on DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis: involvement of inflammation, Ras-ERK pathway and apoptosis. **Life Sci.** v. 31, n.85, p. 196-205. Jul 2009.

CHEN, C. N., WU, C. L. E 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.

CHEN, Y. K.; HSUE, S. S.; LIN, L. M. Correlation between inducible nitric oxide synthase and p53 expression for DMBA-induced hamster bucal-pouch carcinomas. **Oral Dis**; v.9, p. 227-234, 2003.

CLARDY, J. ; WALSH, C.; **Nature**, v. 829, p. 432, 2004.

COLETTA, R. D.; GRANER, E.; LOPES, M. A.; VARGAS, P. A.; JORGE, J. JR.; ALMEIDA, O. P. Os avanços da biologia molecular e o câncer bucal. . **Rev. APCD**, v.56, p.62-66. 2002.

COS, S.; GONZÁLEZ, A.; GÜEZMES, A.; MEDIAVILLA, M. D.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. **Int J Cancer.** v. 15, n. 118, p. 274-8, 2006.

COSTA, A. L. L. et al. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, n. 3, p. 216-20, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72-79, 2005.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents (dagger). **Chem Rev.** 2009 May 7. [Epub ahead of print]

CRANE, E. Bees and beekeeping, science, practice, and world resources. New York: **Cornell University Press**, v. 614 p. 1990.

DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; BARBOSA, H.S.; CASTRO, S. L. de. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 101, n.2, p. 207-211, Rio de Janeiro, 2006.



DAUGSH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. **ECAM**; 1-7, 2007.

DAUSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do brasil e suas características químicas e biológicas**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP/SP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

DEDIVITIS, R. A. et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 70, n. 1, p. 35-40, 2004.

DEWICK, P. M. The mevalonate and Deoxyxylulose phosphate Pathways: terpenoids and Steroids. In: DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. United Kingdom, School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham, John Wiley & Sons, Ltd, 2 ed., Chap. 5, p. 167, 2002.

DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin, **Cancer Letters**, v. 233, p. 181-190, 2005.

EL-KHAWAGA, O. A.; SALEM, T. A.; ELSHAL, M. F. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. **Clin Chim Acta.**, v. 338, n.1, p. 11-6, Dec. 2003.

EL-MOFTY, S. Chemical carcinogenesis in the rat submandibular gland. **Egypt Dent J.**, v. 23, n.2, p. 65-75, 1977.

FREITA, V. S.; LOPES, M. A.; MEIRELES, J. R. C.; REIS, L.; CERQUEIRA, E. DE M. M. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Rev. Baiana de Saúde Pública** v.29, n.2, p.189-199, 2005.

GERVASIO, O. L.; DUTRA, R. A.; TARTAGLIA, S. M.; VASCONCELLOS, W. A.; BARBOSA, A. A.; AGUIAR, M. C. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. **Braz Dent J**, v.12, n.1, p.57-61. 2001.

GIMENEZ-CONTI, I. B.; SLAGA, T. J. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. **J Cell Biochem Suppl.**, v. 17, p. 83-90. Review. 1993.

GRAIKOU, K.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L.; CHINOU, I.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; LITAUDON, M. New diterpenes from *Croton insularis*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 685-8, 2004.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 196-98, 1999.



HIROTA, K.; MORIKAWA, K.; HANADA, H.; NONAKA, M.; NAKAJIMA, Y.; KOBAYASHI, M.; NAKAJIMA, R. Effect of genistein and daidzein on the proliferation and differentiation of human preadipocyte cell line. **J Agric Food Chem.** v.58, n.9, p.5821-7, 2010.

HIRST, G. L.; BALMAIN, A. Forty years of cancer modeling in the mouse. **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 1974-1980, 2004.

HUMPHRIS, G. M.; ROGERS, S. N. The association of cigarette smoking and anxiety, depression and fears of recurrence in patients following treatment of oral and oropharyngeal malignancy. **Eur J Cancer Care (Engl).** v. 13, n.4, p. 328-35, 2004.

IDE, F.; SUKA, N.; KITADA, M.; SAKASHITA, H.; KUSAMA, K.; ISHIKAWA, T. Skin and salivary gland carcinogenicity of 7,12- dimethylbenz[a]anthracene is equivalent in the presence or absence of aryl hydrocarbon receptor. **Cancer Lett.**, v. 214, n. 1, p. 35-41, 2004.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2009: Incidência do câncer oral no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer.** Rio de Janeiro: INCA; 2010. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>.

ITOKAWA, H.; WANG, X.; LEE, K-H. Homoharringtonine and related compounds. In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN D. (eds). Anticancer agents from natural products. Boca Raton, Florida, **Brunner-Routledge Psychology Press**, Taylor & Francis Group, pp. 47-70. 2005.

JIANG Q, PAYTON-STEWART F, ELLIOTT S, DRIVER J, RHODES LV, ZHANG Q, ZHENG S, BHATNAGAR D, BOUE SM, COLLINS-BUROW BM, SRIDHAR J, STEVENS C, MCLACHLAN JA, WIESE TE, BUROW ME, WANG G. Effects of 7-O substitutions on estrogenic and anti-estrogenic activities of daidzein analogues in MCF-7 breast cancer cells. **J Med Chem.** v. 53, n.16, p.:6153-63. 2010

JIN, Q. Y.; ZHANG, X. M.; KANG, J. X.; WANG and W. H. Zhao Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. **Ann Oncol.** v.21, n. 2, p. 263-268, 2010.

JIN, Y.T., et al. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma of young adults. **Oral Oncol.**, v. 35, n. 3, p. 251-6, 1999.



KANG,N. J.;LEE, K.; ROGOZIN, E. A.; YONG-YEON CHO, Y-Y.;HEO,Y-S.; BODE, A. M.;LEE, H.J.; DONG, Z. Equol, a Metabolite of the Soybean Isoflavone Daidzein, Inhibits Neoplastic Cell Transformation by Targeting the MEK/ERK/p90RSK/Activator Protein-1 Pathway. **The journal of biological chemistry** v. 282, n. 45, p. 32856–32866, November 9, 2007.

KANTARJIAN, H. M.; O'BRIEN, S.; ANDERLINI, P.; TALPAZ, M. Treatment of chronic myelogenous leukemia: current status and investigational options. **Blood**, v. 87, p. 3069-81,1996.

KATIYAR, S. K.; MUKHTAR, H. Tea antioxidants in cancer chemoprevention. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 59-67, 1997.

KAVITHA, K.; MANOHARAN, S. Anticarcinogenic and antilipidperoxidative effects of tephrosia purpurea (linn.) Pers. In 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (dmba) induced hamsters buccal pouch carcinoma. **Indian J Pharmacol**, v.38, n.3, p.185-89, 2006.

KHALIL ML. BIOLOGICAL activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pac J Cancer Prev.**, p. 22-31, 2006.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm.**, v. 55, p. 423-430, 2005.

KUFFER, R.;LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). **Oral Oncol**, v.38, n.2, Feb, p.125-130, 2002.

KUJAN, O.; KHATTAB, A.; OLIVER, R. J.; ROBERTS, S. A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncol**. v. 43, n.3, p. 224-31, Mar. 2007.

KUJAN, O.; OLIVER, R. J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S. A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**; v. 42, n.10, p. 987-93, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: **Elsevier Saunders**. p. 1525, 2005.

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

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence From Laboratory Investigations, **American Journal Clinican Nutrition**, v. 81 (suppl), p. 284- 291, 2005.



LAUWAET T, ANDERSEN Y, VAN DE VEN L, ECKMANN L, GILLIN FD. Rapid detachment of *Giardia lamblia* trophozoites as a mechanism of antimicrobial action of the isoflavone formononetin. **J Antimicrob Chemother.** v. 65, n.3, p.531-4.. 2010

LEE, Y. T.; DON, M. J.; HUNG, P. S.; SHEN, Y. C.; LO, Y. S.; CHANG, K. W. et al. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. **Cancer Lett.** v.223, p.19–25, 2005.

LI, C.; LEE, D.; GRAF, T. N.; PHIFER, S. S.; NAKANISHI, Y.; BURGESS, J. P.; RISWAN, S.; SETYOWATI, F. M.; SARIBI, A. M.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; FALKINHAM, J. O. 3rd.; KROLL, D. J.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; OBERLIES, N. H. A hexacyclic ent-trachylobane diterpenoid possessing an oxetane ring from *Mitrephora glabra*. **Org. Lett.**, v. 7, p. 5709-12, 2005.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; ESUMI, H.; KADOTA, S. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. **J Nat Prod.** v.73, n.4:623-7, 2010.

LI, H.; KAPUR, A.; YANG, J. X.; SRIVASTAVA, S.; MCLEOD, D. G.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; DAUGSCH, A.; PARK, Y. K.; RHIM, J. S. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of brazilian propolis and its botanical origin. **Int. J. Oncol.** v. 31, n.3, p. 601-6, 2007.

LIAO, H. F.; CHEN. Y. Y.; LIU, J. J.; HSU, M. L.; SHIEH, H. J.; LIAO, H. J. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. **J Agr Food Chem**; 51:7907–12, 2003.

LIMA, N. L.; TAVEIRA, L.A.A. Estudo das alterações morfológicas causadas pela indução concomitante de DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor na carcinogênese química bucal. **Rev. FOB**, v.7, n.1/2, p.61-66, 1999.

LIN, W. L.; LIANG, W. H.; LEE, Y. J.; CHUANG, S. K.; TSENG, T. H. Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75(NTR) in C6 glioma cells. **Chem Biol Interact.** v.188, n.3, p.:607-15. 2010.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 388-395, 2007.

LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 32, n. 3, p. 125-138, Mar. 2003.



LUO, J.; SOH, J. W.; XING, W. Q.; MAO, Y.; MATSUNO, T.; WEINSTEIN, I.B. PM-3 a benzo-gamma-pyran derivative isolated from propolis, inhibits grow of MCF-7 human breast cancer cells. **Anticancer Res**; v.21, n.3B, p.1665-1671, 2001.

LUSTOSA, S.R. **Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife/PE, 2007.

MAIA-ARAUJO, Y. L. F. **Estudo Da Atividade Antimicrobiana De Variedades De Própolis da Região da Foz do Rio São Francisco – Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes, UNIT, Aracaju/SE, 2009.

MAINENTI, P.; ROSA, L. E. B. Carcinogênese química experimental em glândulas salivares: revisão da literatura. **Rev Brás Cancerol.**, v. 4, n.2, p. 167-174, 2008.

MANOHARAN, S. et al. Evaluation of anticarcinogenic effects of Clerodendron inerme on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Singapore Med J**, Singapore, v. 47, n. 12, p. 1038-1043, Dec. 2006.

MARCUCCI, M. C. Chemical composition, plant origin and biological activity of brazilian propolis. **Phytochemistry**, v.2, p.234-237, 1999.

MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo state. Zeitschrift für Naturforschung Section C: **Biosciences**, v.53, n.1-2, p.117-119, 1998.

MARDER, M.; PALADINI, A. C. GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure **Curr Top Med Chem**. v.2, n.8, p.853-67, 2002.

MATIAKIS, A. et al. The role of the time of application of the promoter in two-stage chemically induced carcinogenesis in the oral mucosa: experimental study in the rat. **Ann Dent**, New York, v. 53, n. 2, p. 16-20, 1994.

MENDONÇA, L. S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados a própolis vermelha**. Qualificação de Dissertação do Mestrado - Universidade Tiradentes/Sergipe. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. Aracaju, Brasil, 2010.

MISHIMA, S.; ONO, Y.; ARAKI, Y.; AKAO, A. Y.; NOZAWAB, Y. Two Related Cinnamic Acid Derivatives from Brazilian Honey Bee Propolis, Baccharin and Drupanin, Induce Growth Inhibition in Allografted Sarcoma S-180 in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** v. 28, n.6, p. 1025—1030, 2005.



MOHAN, K. V. P. C. et al. Antiproliferative and apoptosis inducing effect of lactoferrin and black tea polyphenol combination on hamster buccal pouch carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1760, n. 10, p. 1536-1544, 2006.

MOHAN, K. V. P. C. et al. Comparative evaluation of the chemopreventive efficacy of green and black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. **Clin Biochem**, Toronto, v. 38, n. 10, p. 879-886, 2005.

MOHAN, K.V.; GUNASEKARAN, P.; VARALAKSHMI, E.; HARA, Y.; NAGINI, S. In vitro evaluation of the anticancer effect of lactoferrin and tea polyphenol combination on oral carcinoma cells. **Cell Biol Int.**, v. 31, n.6, p. 599-608, 2007.

MORRIS AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. **J Dent Res.** v. 40, p. 3-15. 1961.

NAUTA, J. M.; VAN LEENGOED, H. L.; WITJES, M. J.; NIKKELS, P. G.; STAR, W. M.; VERMY, A.; ROODENBURG, J. L. Photofrin-mediated photodynamic therapy of chemically-induced premalignant lesions and squamous cell carcinoma of the palatal mucosa in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 26, n.3, p. 223-31, 1997.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E.; **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.** v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E.A.. **Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy**. Current Cancer Drug Targets, New York, v.2, p. 279-308, 2002.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. **The influence of natural products upon drug discovery**. Natural Products Report, Cambridge, v.17, p. 215-234, 2000.

NISHINO, H. Cancer prevention by natural carotenoids. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 86-91, 1997.

NOBILI, S.; LIPPIB, D.; WITORTC, E.; DONNINIC, M.; BAUSI, L.; MINIA, E.; CAPACCIOLIC, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research.**, v. 59, p. 365-378, 2009.

NOVAIS, C. B.; SIQUEIRA, J. O. Aplicação de formononetina na colonização e esporulação de fungos micorrízicos em braquiária. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.5, p.496-502, maio 2009.



O'NEILL, P. Environmental chemistry. 3rd ed. New York: **Blackie Academic & Professional**; 1998.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products **research.. J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 129-135, 2004.

ODUKOYA, O.; SHKLAR, G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 58, n. 3, p. 315-320, Sept. 1984.

OIKAWA, S.; FURUKAWAA, A.; ASADA, H.; HIRAKAWA, K.; KAWANISH, S. Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species. **Free Radic Res.** v.37, n.8, p.:881-90, 2003.

OLIVEIRA, L. B. O. de. **Angioarquitetura de carcinoma de células escamosas, quimicamente induzido em bolsa jugal de hamster: análise em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura de réplicas vasculares.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Programa de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

OLIVEIRA, L. R. DE.; RIBEIRO-SILVA,A. ;ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira.**J Bras Patol Med Lab.** v. 42. p. 385-392, 2006.

OLIVEIRA, P.A. et al. Chemical carcinogenesis. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 79, n.4, p. 593-616, 2007.

OLIVEIRA, V. C.; BASTOS, E. M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (ASTERACEAE) visando a identificação da origem botânica da própolis. **Acta bot. Bras.**, v.12, n.3, p.431-439, 1999.

ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C.; SOARES, A. M. V. C.; CALVI, S. A.; OLIVEIRA, S. L.; SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **J Venom Anim Toxins.** v.6, p. 205-219, 2000.

ORSOLIC, N, KNEZEVIC, AH, SVER, L, TERZIC, S, BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J Ethnopharmacol**; 94: 307-315, 2004.

ORSOLIĆ, N.; TERZIĆ, S.; MIHALJEVIĆ, Z.; SVER, L.; BASIĆ, I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. **Biol Pharm Bull.** v. 28, n.10, p. 1928-33, 2005.



ORSOLIC, N.; SARANOVIC, A. B.; BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Med.** v.72, p.20–7, 2006.

PARAJULI, P.; JOSHEE, N.; RIMANDO, A. M.; MITTAL, S.; YADAV, A. K. In vitro Antitumor Mechanisms of Various Scutellaria Extracts and Constituent Flavonoids. **Planta Med.** v.75, p.41 -48, 2009.

PARK, Y. P., IKEGAKI, M., ABREU, J. A. D. S. E ALCICI, N. M. F. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18, n.3, p. 313-318, 1998.

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.

PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quimica Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PETERSEN, P. E. Strengthening the prevention of oral cancer: the WHO perspective. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 33, n.6, p. 397-9, 2005.

PINHEIRO, M. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha.** Dissertação de Mestrado - Universidade Tiradentes/Sergipe. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. Aracaju, Brasil, 2009.

PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de Xylopia langsdorffiana St. Hil. & Tul. (Annonaceae).** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2010.

REGEZI, J. A.; SCIUBA, J. J.; JORDAN, R.; C. K. **Patologia bucal: correlações clinicopatológicas,** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REIBEL J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 14, p. 47–62, 2003.

RODRIGUES, M. A. M.; CAMARGO, J. L. V. **Carcinogênese.** In: Montenegro MR, Franco M. Patologia: processos gerais. São Paulo: Atheneu, p. 223-40, 1999.

RUI, H. Research and development of cancer chemopreventive agents in China. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 7-11, 1997.



RUIZ MENDEZ, A.; PASEIRO GARRIGA, M. A.; ESCALONA VELOZ, R.; MARCOS CORZO, L. [Prevalence of malignant oral neoplasms in the Celia Sanchez Clinicosurgical Hospital from 1982 to 1985]. **Rev Cubana Estomatol**, v.26, n.3, Jul-Sep, p.235-241, 1989.

RUSSO, A., LONGO, R. E VANELLA, A. **Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin**. *Fitoterapia*, v. 73, p. S21-S29. 2002.

SACKS, P. G. Cell, tissue and organ culture as in vitro models to study the biology of squamous cell carcinomas of head and neck. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 15, n.1, p. 27-51, 1996.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **eCAM**. v. 2, p.: 33- 38. 2005.

SALLEY JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res.*, v. 33, n.2, p. 253-62, 1954.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; IGNACIMUTHU, S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene-induced mammary tumors in rats. **Chem Biol Interact**, Amsterdam, v. 164, n. 1/2, p. 1-14, Dec. 2006.

SANTIS, H.; SHKLAR, G.; CHAUNCEY, H. H. Histochemistry of experimentally induced leukoplakia and carcinoma of the hamster buccal pouch. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1964.

SCHUSSEL, J. L.; PINTO JR, D. S.; MARTINS, M. T. Altered beta- catenin expression related to cancer progression on actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. **Annals of Diagnostic Pathology**, 2010.

SCHWARTZ, J.; BAKER, V.; LARIOS, E.; DESAI, D.; AMIN, S. Inhibition of experimental tobacco carcinogen induced head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol.**, v. 40, n.6, p. 611-23, 2004.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol**, v.36, n.3, May, p.256-263, 2000.

SEEMAYER, T. A. The recessive mutational concept of oncogenesis. **Pediatr Pathol.**, v. 10, n.6, p. 859-65, 1990.

SFORCIN JM, KANENO R, FUNARI SRC. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **J Venom Anim Toxins**. v. 8, p. 19-29. 2002.



SHA, N.; GUAN, S. H.; LU, Z. Q.; CHEN, G. T.; HUANG, H. L.; XIE, F. B.; YUE, Q. X.; LIU, X.; GUO, D. A. Cytotoxic constituents of chinese propolis. **J Nat Prod.**, v. 72, n.4, p. 799-801, 2009.

SHABANY, K. et al. Rapid in vivo assay for topical oral cancer chemopreventive agents. **Int J Oncol**, Athens, v. 21, n. 1, p. 159-164, July 2002.

SHKLAR, G. Development of experimental oral carcinogenesis and its impact on current oral cancer research. **J Dent Res**, Chicago, v. 78, n. 12, p. 1768-1772, Dec. 1999.

SHKLAR, G. Recent advances in experimental oral and salivary gland tumors. **J Oral Surg.**, v. 28, n.7, p. 495-500, 1970.

SHOEB, M. Anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh J. Pharmacol.**, v. 1, p. 35-41. 2006.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **J Ethnopharmacol.**, v. 99, n. 13, p. 69-73, 2005.

SILVA, B. B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP, 2008.

SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 18, p. 84-89, 2008.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.** In: London: p. 152-178, 1999.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3- 4, p. 375-383, 2000.

SMUCKLER, E.A. Chemicals, cancer and cancer biology. **West J. Med.**, v. 139, n.1, p. 55-74, 1983.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Braz Journal of Pharmacognosy.**, v. 17, n.1, p. 85-93, Jan./Mar., 2007.



STAHELIN, H. Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. **Eur. J. Cancer**, v. 9, p. 215-21, 1973.

STEIDLER, N. E.; READE, P. C. Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 43- 47, Jan. 1986.

SYRJANEN, S. Human papilomavirus (HPV) in head and neck câncer. **J. Clin. Virol.**, v.32, Supl. I. p. S59-66, 2005.

SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; BRONIKOWSKA, J.; MERTAS, A.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Ethanolic Extract of Propolis Augments TRAIL-Induced Apoptotic Death in Prostate Cancer Cells. **eCAM.**, p. 1- 10, 2009.

TELLES, O. S. Carcinogênese biomolecular em cancerologia. **J Biomolec med Free Rad.**; v. 5, n.2, p. 49-52, 1999.

TRUSHEVA, B; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **e-CAM.**, v. 3, p. 249- 254, 2006.

UMEDA, M.; YOKOO, S.; KOMORI, T.; NISHIMATSU, N.; SHIBUYA, Y.; FUJIOKA, M. Experimental model of invasion and metastasis by orthotopic transplantation of oral squamous and adenoid carcinomas into tongue of nude mice. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v. 39, n.5, p. 376-80, 2001.

VERONEZ, R. **Revisão de literatura: própolis na clínica médica internacional**. 2000.

VIDEIRA, R. S.; DEBONI, M. C. Z.; ARAÚJO, C. A. de S.; OKAMOTO, A. C.; MELHADO, R. M. Oncogenes e desenvolvimento do câncer. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**; v. 6, n.1, p. 71-76, 2002.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA. S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WALL, M. E.; WANI, M. C. The alkaloids, **Academic Press**: New York, 1998.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A.; J. **Am. Chem. Soc.**, v. 88, p. 3888, 1966.

WANG, W. C.; LIANG, S. L.; CHEN, Y. K.; LIN, L. M. The therapeutic effect of fractionated radiation on DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**; 44:1160-1166, 2008.



WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 46, p.351-360, 2002.

WARNAKULASURIYA S, JOHNSON NW, VAN DER WAAL I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med.**, v. 36, p. 575– 80, 2007.

WENDT, L. R. R. **Efeitos do Álcool e da Cafeína em Modelo de Lesões Intra-epiteliais e de Carcinogênese Pancreática Induzidas por 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) em Camundongos.** Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, Brasil, 2004.

WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J. Principles of Testing for Carcinogenic Activity. In: HAYES, A W. (ed). **Principles and Methods of Toxicology** (4th ed). Philadelphia: Taylor & Francis., Chap 20, p. 959-1000; p.1887, 2001.

WOOLF, N. Oncogenesis. In: Woolf N. **Pathology: basic and systemic.** London: W.B. Saunders Company; p. 290-304, 1998.

YÁÑEZ,J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.;CASTILLO,J.; BENAVENTE-GARCÍA,O.; CANTERAS, M.;TERUEL, J. A. L. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity.**Nutrition and cancer**, 49, n.2, 191–199, 2004.

YANG,Y.; MAO, W-J.; LI,H-Q.;ZHU,T-T.; SHI,L.; LV,P-C.; ZHU, H-L. Synthesis and Biological Evaluation of 7-O-Modified Formononetin Derivatives.**Research Letters in Organic Chemistry**, 2008.

YU, X.; WANG, W.; YANG, M. Antioxidant activities of compounds isolated from *Dalbergia odorifera* T. Chen and their inhibition effects on the decrease of glutathione level of rat lens induced by UV irradiation,” **Food Chemistr.**, v. 104, n.. 2, pp. 715–720, 2007.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho,V.; **Quim. Nova**, v. 24, p. 147, 2001.

YUSPA, S.H.;POIRIER, M. C. Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. **Adv. Cancer Res.**, v. 50: p. 25-70, 1988





A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: AÇÃO PROFILÁTICA DA PROPÓLIS VERDE SOBRE LESÕES ORAIS DMBA - INDUZIDAS		
Pesquisador Responsável Andréa Ferreira Soares		
Data da Versão 10/12/2008	Cadastro 191208	Data do Parecer 07/04/2009
Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais		
Objetivos do Projeto		
Sumário do Projeto		

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Ausente
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
-------------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
------------------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	Situação
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 42 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crerios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
-----------------------------------	-----------

Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes



Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto é de relevância no que diz respeito a ampliação do arsenal terapêutico para produtos fitoterápicos


Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes

Bárcia 2.2



Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Análise citomorfológica dos efeitos da própolis vermelha sobre lesões orais pr-e-malignas e malignas induzidas por DMBA

Pesquisador Responsável Andréa Ferreira Soares

Data da Versão 10/12/2008

Cadastro 181208

Data do Parecer 21/01/2009

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto
ausência do CD ou disquete

Sumário do Projeto
ausência do CD ou disquete

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
-------------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
------------------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 42 Local 1
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Outros vínculos de dependência
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crêrios de inclusão e exclusão	Ausentes
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Adequado
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Ausente
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Comentário
Data de início prevista	mês 1
Data de término prevista	mês 12
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Outras fontes

Página 1-2


Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes



Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento	
Referências Bibliográficas	Adequadas
Comentários sobre as Referências Bibliográficas	
Recomendação	
Aprovar	
Comentários Gerais sobre o Projeto	
O tema de investigação do projeto em questão atende a Res. CNS 196/96, por favor adicione o CD ou disquete no projeto	


Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes