

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PRÓPOLIS
VERDE SOBRE CARCINOGENESE DÉRMICA INDUZIDA
POR 9,10 DIMETIL 1,2 BENZANTRACENO (DMBA)**

ROSE NELY PEREIRA FILHO

ARACAJU/SE

Março/2013

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PRÓPOLIS
VERDE SOBRE CARCINOGENESE DÉRMICA INDUZIDA
POR 9,10 DIMETIL 1,2 BENZANTRACENO (DMBA)**

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 Saúde e Ambiente.

ROSE NELY PEREIRA FILHO

Orientador (es)

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, D.Sc.

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.

ARACAJU/SE

Março – 2013

P436e Pereira Filho, Rose Nely

Efeito da administração oral de própolis verde sobre carcinogênese dérmica induzida por 9,10 dimetil 1,2 benzantraceno (DMBA). / Rose Nely Pereira Filho; orientadores: Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju, 2013.

88p. : il

Inclui bibliografia.

Dissertação de mestrado (Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1.DMBA. 2. Própolis. 3. Câncer. 4. Ensaio biológico. I. Albuquerque Junior, Ricardo Luiz Cavalcanti de. (orient.) II. III. Cardoso, Juliana Cordeiro. (orient.) IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 616. 5-006.6-03

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE CARCINOGENESE
DÉRMICA INDUZIDA POR 9,10 DIMETIL 1,2 BENZANTRACENO (DMBA)**

ROSE NELY PEREIRA FILHO

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

Andréa Ferreira Soares, D. Sc.
Examinadora

Kátia Perez Gramacho, D. Sc.
1º Suplente

Luiz Pereira da Costa, D. Sc.
2º Suplente

ARACAJU
Março - 2013

E assim, eu vou penetrando nas brechas, portas e caminhos que vão se abrindo, à simples menção da minha passagem ou entrada; vou aos poucos retomando o caminho que há muito, foi ficando para trás. Lá atrás quando a semente plantada na terra germinou, floresceu, deu frutos mesmo em terra árida. Porém, os ventos não foram propícios dados a fragilidade da planta, a mais leve brisa a sacudia fortemente trazendo-a de volta ao ponto de partida quando, por vezes precisou ser mais cuidada, regada, protegida e ficar sob a sombra de árvores mais frondosas, que ramificam e seus ramos seguem sempre pelo caminho da luz, uma fotossíntese de vida e conhecimento que se vê apenas em árvores que não se dobraram as inconsistências das tempestades.

Seguirei então, trilhando o novo caminho da luz nos galhos do conhecimento, atenta a mudança dos ventos até que eu possa fortalecer meu tronco, meus galhos e me torne uma árvore resistente, frutífera e ainda que não seja tão frondosa eu possa, sob a pressão dos ventos e tempestades, curvar-me e reverenciar sabiamente a ação da natureza e, como o bambu, vergar respeitosa e corajosamente, suportando o vai e vem dos ventos tentarei não sucumbir, e dessa forma, fortalecerei minhas raízes.

A minha eterna gratidão às árvores frondosas que me abrigaram, as que me abrigam e as que no futuro poderão ainda me oferecer sombra e abrigo.

Rose Nely

Dedico esse trabalho...

À **DEUS**, pelo amor incondicional e proteção a mim estendidos. Pelos anjos, enviados com a missão de me proteger, conduzir e abençoar os caminhos trilhados ao longo dessa jornada de crescimento pessoal, intelectual e profissional. Pela sua providência Divina para comigo e os meus. Por me fortalecer nos momentos difíceis enviando seu bálsamo consolador, me encorajando para seguir em frente em meio a qualquer adversidade. Obrigada meu **DEUS** e Senhor!

Aos meus pais, que esperaram muito até que eu me tornasse grande, grande o suficiente para seguir o caminho em busca das minhas realizações e fosse capaz de olhar o mundo de frente e agradecer pelas vitórias, todas construídas com base nos seus ensinamentos. No entanto, durante a espera, eles adormeceram, não esperaram para ouvir em voz alta, toda minha gratidão e o tanto quanto eles contribuíram para minha formação, para o meu sucesso e crescimento. Aos dois pilares da minha formação **José Guilherme** e **Luzia Pereira** (*in memoriam*), minha eterna gratidão. Obrigada! Eu amo vocês.

As minhas filhas, **Ana Carolina**, **Tessy Iracema** e **Anna Catharina**, pelo esforço e compreensão nas ausências, nos períodos mais críticos, quando a mãe é presença necessária. Que a minha ausência durante esse tempo da suas vidas, tenha sido percebida como um incentivo para o crescimento profissional, possibilitando maior desenvolvimento pessoal. Vocês foram o maior incentivo na busca do meu crescimento e realização profissional. Ao meu neto **Arthur** pela compreensão ao silenciar, mesmo sem entender, esperando pra brincar, até adormecer. Obrigada pelo apoio e carinho. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é sempre difícil, até porque, devemos agradecer prontamente a **DEUS**, e aos que nos apoiam, em todas as etapas da vida. Agradecer é também valorizar a credibilidade do outro em nós, por estar contribuindo para o nosso crescimento, nas diferentes fases de nossas vidas. Crescer é doloroso! Mesmo assim, acredito que qualquer que tenha sido a dor sentida durante essa caminhada, foi para o meu melhor. Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente, colaboraram com o meu crescimento profissional. As minhas irmãs, **Nely, Iara, Márcia, Joana e Liliana**, pelo incentivo, pela força, e por acreditarem que eu seria capaz de ir mais longe, e de poder fazer mais, meu carinho e gratidão. O apoio de vocês foi muito importante para a conclusão desse trabalho. Obrigada! Aos meus irmãos, obrigada pelo carinho e amizade. As sobrinhas, **Ayatomy, Estelinha, Lidi, Isis, Ilca**, e demais, dedico a vocês todo meu carinho e gratidão.

As amigas, das quais me afastei nesse período. Saudades dos encontros, das conversas divertidas, algumas não compreendem, outras vêem como um capricho, e as que acreditam me fortalecem com seus incentivos e encorajamento. Agradeço a todos os colegas do mestrado pelo convívio nessa nova etapa da minha vida quando aprendi a conviver melhor com vocês, cada um, a seu modo, colaborou com meu crescimento pessoal. A **Marismar Fernandes**, meu carinho e gratidão pela força e incentivo na fase crítica e por acreditar, que eu posso ir mais longe, obrigada amiga! As demais colegas: **Fany e Camilinha** eu agradeço pela paciência e tolerância durante nosso convívio no LMBE. Obrigada meninas! À **Isana, Andréa, Ana Célia, Catharina, Cadú, Renaldo, João e Luciano**, foi um privilégio conhecer todos vocês.

Meus agradecimentos ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa/ITP que ao me acolher, me proporcionou oportunidades inovadoras no âmbito profissional especialmente, o laboratório de Morfologia e biologia Estrutural (**LMBE**), que incentivou e contribuiu para a concretização do meu sonho de ser mestra junto com seus colaboradores. Agradeço de coração a **Danielle (Danny)**, pela prestatividade e direcionamento na escrita. Uma ajuda que foi fundamental, desde o início até a concretização desse projeto. MUITO obrigada querida! Agradeço ainda a **Felipe Batista (Felipinho)**, e **Danilo Barauna**, pela participação inicial nesse trabalho. Vocês são geniais! Agradeço ainda, aos demais colegas e colaboradores da família LMBE: **Ângela Alves** (Angelinha a 4ª filha), pela carinhosa e prestimosa ajuda,

Camila Dantas e Alessandra (Alê), pelo incentivo e força em várias situações necessárias; **Tássia, Tâmara, Ailma, Lucas Sandes, Baraúna, Ricardo Guilherme, Raquel, Talita Bastos, Douglas** e aos demais alunos, meu especial carinho e gratidão. O apoio e a compreensão de vocês foi muito importante para um convívio equilibrado contribuindo, assim, para o sucesso dos trabalhos aqui desenvolvidos. Meus agradecimentos aos filhos que ao longo do tempo, nós adotamos, crescendo assim, a família do coração. A esses filhos especiais **Genecy Calado e José Cleveilton**, minha reverência. Jamais esquecerei tamanha gentileza e dedicação. Vocês são especiais! Por todo apoio que vocês me prestaram, muito obrigada! Serei sempre grata.

Genecy, a quem serei sempre grata por ter ficado ao meu lado, inclusive nos seus momentos de lazer. Nunca esquecerei sua atenção, amizade e carinho. Essas são algumas das qualidades que lhe tornaram um filho tão especial, um filho do coração!

À Prof^a Dra. **Juliana Cordeiro Cardoso**, muito obrigada pela atenção e alegria com que me recebeu como sua orientanda. Sua receptividade foi importante num momento de grande realização da minha vida. Acreditar em mim foi à maior prova de confiança para a concretização desse sonho. Você, mais uma vez, fará parte da minha história. Obrigada pelo apoio, paciência, especialmente, pelo crédito a mim depositado, um suporte nos momentos difíceis. Muito Obrigada!

À Prof^a Dra. **Margarete Zanardo**, muito obrigada pela gentileza. Sempre que solicitada, fui muito bem direcionada, mesmo em momentos de grande ocupação você não hesitou em me atender e orientar nos questionamentos por mim não compreendidos. Obrigada!

Ao Prof. Dr. **Francisco Prado Reis** pela oportunidade do retorno a esta casa, contribuindo para meu crescimento profissional, sendo compreensivo nas minhas ausências, possibilitando desta forma, melhor aproveitamento das oportunidades para o meu desenvolvimento profissional.

Meus sinceros agradecimentos aos demais professores do Mestrado em Saúde e Ambiente pela colaboração, apoio e pelo carinho com que me receberam.

As secretárias da pós-graduação **Thaise e Aninha** obrigada é muito pouco pelo muito que vocês fizeram. Valeu pelo apoio. OBRIGADA MENINAS!

Agradecimento especial...

Ao Profº Dr. **Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior**, ou simplesmente Ricardinho, uma árvore frondosa do conhecimento! A você toda minha gratidão! Não sei se conseguiria num espaço tão pequeno citar e agradecer tudo quanto você tem me proporcionado. Você é um campo fértil, pronto para germinar conhecimento, e aqueles que estão a sua volta são saciados com os frutos de sua sabedoria. Não fazer parte desse campo é pisar em terra árida e seca. Sei que estou apenas engatinhando lentamente pela estrada que você passou correndo, quem sabe voando, pois os gênios correm pelos pensamentos férteis de suas criações. Os anjos, estes sim, voam através da luz, refletindo bondade imensa que emana da sua espiritualidade. Você é o anjo que, de algum modo, foi enviado para iluminar e agraciar não só a minha vida, mas a de muitos outros aprendizes. Sou imensamente grata pela aceitação como sua orientanda, como colaboradora, aprendiz de sua sapiência e, principalmente, amiga para vida. Agradeço, desde já, pela compreensão que sempre demonstrou em momentos difíceis. Devido a isso, e tantos outros feitos, fico imensamente realizada pela confiança depositada em mim, acreditando no meu potencial, enfrentando medos e superando desafios. Finalmente, prontos para lutar e vencer.

Assim são meus anjos, e você, Ricardinho, é um deles, cumprindo a intensa missão de abrir caminho para os que pretendem um dia, tornar-se árvore. Uma árvore que possa ramificar frutos do bem, do conhecimento e da determinação. Todos esses ramos, germinados de sua grande árvore, assim determinada por Deus. MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Câncer	21
3.1.1 Câncer de pele	22
3.1.2 Promotores do câncer	24
3.2 Produtos naturais	26
3.2.1 Produtos naturais na carcinogênese	28
3.3 Produtos apícolas	30
3.3.1 Própolis	33
3.3.2 Própolis verde	34
3.3.3 Própolis e Atividade Antitumoral	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
7. ARTIGO CIENTÍFICO	57
8. CONCLUSÕES GERAIS	79
ANEXOS	81
A – Parecer do comitê de ética	82
B – Submissão do artigo	85

LISTA DE TABELAS

		Pg.
Tabela 1	Distribuição dos animais nos grupos experimentais de acordo com o tratamento	62
Tabela 2	Gradação histológica de malignidade dos carcinomas de células escamosas DMBA-induzidos nos grupos experimentais	68
Tabela 3	Avaliação histológica da intensidade inflamatória dos carcinomas de células escamosas nos grupos experimentais	69

LISTA DE FIGURAS

		Pg.
Figura 1	Avaliação do peso corpóreo dos animais dos grupos experimentais durante o período experimental	64
Figura 2	Aparência clínica dos tumores cutâneos DMBA-induzidos.	65
Figura 3	Avaliação macroscópica do volume médio tumoral e do índice de indução tumoral nos grupos experimentais	66
Figura 4	Avaliação histológica das estruturas dérmicas	67
Figura 5	Evidenciação histopatológica da infiltração tumoral em estruturas nobres por células neoplásicas	68
Figura 6	Padrão histopatológico da resposta inflamatória na presença células tumorais invasivas nas estruturas dérmicas	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

4NQO -	4-quinolina 1-xido
CA -	Ceratose ctnica
CAPE -	cido caféico éster fenetil
CCB -	Carcinoma de Células Basais
CEC-	Carcinoma epidermoide.
CO₂ -	Dióxido de Carbono
CPNM -	Carcinoma de pele não melanoma.
DMBA -	9,10- Dimetil 1,2-benzantraceno
DNA -	Acido Desoxirribonucléico
EEP -	Extratos Etanólicos da Própolis
EHPV -	Extrato Hidroalcoólico de própolis verde
HPA -	Hidrocarboneto Policíclico e Aromático
INCA -	Instituto Nacional de Câncer.
MC -	Melanoma Cutâneo
OMS -	Organizao Mundial de Saúde
PA -	Pr Análise
PNPIC -	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
UNIT -	Universidade Tiradentes
UV -	Ultravioleta

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE CARCINOGENÊSE DÉRMICA INDUZIDA POR 9,10 DIMETIL 1,2 BENZANTRACENO (DMBA)

ROSE NELY PEREIRA FILHO

O câncer de pele apresenta alta prevalência no mundo, tendo sido estimados cerca de 60 mil novos casos para o Brasil em 2012. Dentre as novas propostas terapêuticas, o potencial anticarcinogênico de diferentes produtos naturais tem sido bastante estudado, particularmente, os sobrevividos das variedades da própolis brasileira. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da administração oral do extrato hidroalcoólico de própolis verde sobre a carcinogênese dérmica em modelo experimental com roedores. Para tanto, foi realizada extração hidroalcoólica de amostra de própolis verde (EHPV) e determinada a concentração de flavonóides. Para o ensaio biológico, foram utilizados 36 camundongos, divididos em 6 grupos (n=6): CTR1 (tratados com tween 80 sem indução tumoral); CTR2 (tratados com 100 mg/kg de EHPV sem indução tumoral); TUM (tratados com água com indução tumoral); PV10 (tratados com 10 mg/kg de EHPV com indução tumoral); PV50 (tratados com 50 mg/kg de EHPV com indução tumoral); e PV100 (tratados com 100 mg/kg de EHPV com indução tumoral). A indução da carcinogênese foi realizada em dias alternados, diferentes ao da gavagem e a aplicação tópica do DMBA, feita no dorso dos animais. Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados, para que a área lesada fosse submetida a exame histológico *post-mortem*. As lesões cutâneas produzidas em dorso de camundongos foram analisadas de acordo com o número e diâmetro médio dos tumores observados em cada camundongo. Os dados obtidos foram expressos sob a forma de média $\pm$ desvio padrão e comparados entre os grupos por meio do teste Anova (*one-way*), seguido da extensão *post-hoc* de Tukey. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05. Realizada a extração hidroalcoólica da amostra de própolis verde, verificou-se que o rendimento do extrato foi de 44,43%. O teor de flavonóides foi de $0,95 \pm 0,44\%$. O número médio de lesões induzidas em TUM ($4,14 \pm 0,89$) foi significativamente maior que em PV10 ($2,05 \pm 1,02$), PV50 ($1,8 \pm 1,92$) e PV100 ($2,5 \pm 1,73$) ($p < 0,05$), não havendo diferença entre os grupos tratados com EHPV ($p > 0,05$). Não houve formação tumoral nos animais do grupo CTR. Não foi observada diferença significativa no diâmetro médio tumoral entre os diferentes grupos estudados, independente do tratamento com EHPV ($p > 0,05$). Os tumores formados nos grupos tratados com EHPV se mostraram histologicamente bem diferenciados, apenas em PV10 foram

evidenciadas lesões *in situ*. A infiltração de estruturas anatômicas nobres foi menos freqüente nos grupos tratados com EHPV ($p<0,05$). Esses dados sugerem um provável efeito inibitório do EHPV, ainda que parcialmente, sobre a carcinogênese quimicamente induzida por DMBA e que tal efeito quimiopreventivo não estaria relacionado a uma atividade dose-dependente.

Palavras-chaves : DMBA; própolis; câncer de pele; ensaio biológico.

EFFECT OF ORAL ADMINISTRATION OF GREEN PROPOLIS CARCINOGENESIS DERMAL INDUCED 9.10 DIMETHYL 1.2 BENZANTHRACENE (DMBA)

ROSE NELY PEREIRA FILHO

Skin cancer is highly prevalent over the world, and about 60 thousand new cases are estimated for 2012 in Brazil. Among the new procedures, the anticancer potential of different natural products have been widely studied, particularly the different varieties of Brazilian propolis. The goal of this study was to analyze the effect of the oral administration of the hydroalcoholic extract of green propolis on skin carcinogenesis in rodent experimental model. Therefore, we performed a hydroalcoholic extraction of green propolis (HEGP) and determined the flavonoids content. For the bioassay, 36 mice were used, assigned into six groups (n=6): CTR1 (treated with tween 80 without tumor induction); CTR2 (treated with 100 mg/kg HEGP without tumor induction); TUM (treated with distilled water with tumor induction); GP10 (treated with 10 mg/kg HEGP with induction of tumor), GP50 (treated with 50 mg/kg HEGP with tumor induction) and GP100 (treated with 100 mg/kg HEGP with tumor induction). The carcinogenesis was induced on the backs of the animals with topical applications of DMBA. After 16 weeks, the animals were euthanized, and the damaged area was subjected to post-mortem histological examination. The cutaneous lesions were analyzed according to the number and diameter of tumors observed in each mouse. The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation and compared between groups by ANOVA (one-way), followed by the *post-hoc* Tukey test. Differences between groups were considered significant when the p value was less than 0.05. The yield of the HEGP was 44.43% and the flavonoid content was $0.95 \pm 0.44\%$. The mean number of lesions induced in TUM (4.14 ± 0.89) was significantly higher than in PV10 (2.05 ± 1.02), PV50 (1.8 ± 1.92) and PV100 ($\pm 2.5 \ 1.73$) ($p < 0.05$), but there was no significant differences between the HEGP-treated groups in the different concentrations ($p > 0.05$). There was no significant difference in means of the tumor diameter between the different groups, regardless the HEGP treatment ($p > 0.05$). Tumors rised in the HEGP-treated groups were shown to be histologically well-differentiated, but only in GP10 *in situ* lesions were observed. The infiltration of noble anatomical structures was less frequent in the groups treated with HEGP ($p < 0.05$). These data suggest a possible partial inhibitory effect of HEGP, on the chemical carcinogenesis induced by DMBA; moreover such chemopreventive effect is unlikely related with a dose-dependent activity of the extract.

Keywords: DMBA, propolis, skin cancer; bioassay.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer representa um conjunto de mais de 100 doenças, em nível citomolecular, tendo em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos vizinhos, sendo classificados de acordo com a localização primária do tumor e do tecido de origem. Atualmente, constitui um problema de saúde pública mundial por sua alta prevalência e por demandar consideráveis investimentos em ações e estratégias para seu controle (COX & SNEYD, 2011; INCA, 2012).

No Brasil, o câncer de pele é considerado a neoplasia maligna de maior incidência e dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostraram ter havido aproximadamente 490.000 novos casos de tumores cutâneos em 2010, sendo o câncer de pele não melanoma (CPNM) responsável por 96% dessas neoplasias (SIMÕES *et al.*, 2008). Além disso, o CPNM corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil e, segundo o INCA para o ano de 2012, estima-se mais 63 mil novos casos (INCA 2012).

O Carcinoma Espinocelular (CEC) é o segundo tipo de CPNM mais comum no mundo, precedido apenas pelo carcinoma de células basais (MARTINS *et al.*; 2007). O CEC é um tumor maligno que afeta epiderme e anexos da pele, sendo os mais altos índices registrados na África do Sul e Austrália, em razão dos elevados níveis de radiação ultravioleta observados nesses países (STAPLES *et al.*, 2006; YARMEL *et al.*, 2008).

O CEC se origina a partir da proliferação de células escamosas atípicas, com caráter invasivo podendo produzir metástases. De modo geral, os CECs podem surgir a partir de lesões não invasivas, como ceratoses actínicas (CA), queilites actínicas, leucoplasias orais e radiodermites crônicas (KAUR *et al.*; 2010).

Para o estudo pré-clínico de diversos agentes antineoplásicos, a carcinogênese experimental é de fundamental importância. O 9,10 Dimetil, 1,2 Benzantraceno (DMBA), potente iniciador carcinogênico do grupo dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, é comumente utilizado na carcinogênese cutânea experimental em camundongos, por ser a pele desses animais muito mais responsiva aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (WILLIAMS; IATROPOULOS, 2001; MAINENTI-ROSA *et al.*, 2008).

Dentre as novas propostas terapêuticas para o câncer, pesquisas investigam o potencial anticarcinogênico de diferentes produtos naturais (CRAGG *et al.*; 2009), com intuito de minimizar as dificuldades encontradas durante o tratamento de pacientes com câncer. Nesse sentido, os extratos brutos de plantas nativas brasileiras testadas, *in vivo* e *in vitro*, têm contribuído favoravelmente no processo antineoplásico podendo ser utilizado como biomateriais de ação farmacológica eficiente (SENEL; MCCLUER; 2004).

Dentre os produtos naturais com potencial anti-neoplásico que vem sendo extensivamente estudados destaca-se a própolis (DEMESTRE *et al.* 2009). Este produto é uma resina balsâmica produzida por abelhas do gênero *Apis*, responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento anticéptico das colméias (VARGAS *et al.*, 2004). A própolis protege as colméias da invasão de insetos e microorganismos, é também muito utilizada pela população para fins medicinais (MARCUCCI, 1996; PARK, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2008).

No Brasil, já foram catalogados e classificados por região 13 tipos de própolis, onde cada amostra parece possuir um perfil químico diferenciado (PARK *et al.*, 2002; ALENCAR *et al.*, 2007). Esse produto conquistou o status de apiterápico por demonstrar amplas ações biológicas (MARCUCCI, 1996; PEREIRA, 2002), com efeito antimicrobiano (PARK *et al.*, 1998; SAWAYA, 2004), antimicótico, imunomodulador (MENEZES, 2005; SZLISZKA, 2009; ARAUJO & MARCUCCI, 2011), cicatrizante e antioxidante, todos atribuídos à presença de flavonóides em sua composição (DAUGSCH *et al.*, 2007). Estudos Adicionais têm demonstrado que os constituintes químicos presentes na própolis, como o fenil-ésteres de ácido cafeico e a quercetina apresentam atividade antitumoral *in vitro* (ORSOLIC *et al.*, 2005).

Diante do exposto, este trabalho propõe-se a avaliar o efeito da administração oral de extratos hidroalcoólico de própolis verde sobre a carcinogênese dérmica quimicamente induzida por DMBA em modelo murino.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o efeito da administração oral de extrato hidroalcoólico de própolis verde sobre a carcinogênese dérmica quimicamente induzida por DMBA em modelo murino.

ESPECÍFICOS

- Extrair compostos ativos da própolis verde utilizando solução hidroalcoólica como solvente extrator.
- Determinar macroscopicamente o número e o diâmetro médio dos tumores induzidos.
- Analisar histologicamente os tumores induzidos quanto à diferenciação tumoral, padrão de invasão e resposta inflamatória.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÂNCER

A palavra câncer tem origem grega *karkínos*, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, considerado o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C. O câncer não é uma doença da modernidade e já foi detectado em múmias egípcias comprovando comprometimento do ser humano por esta afecção há mais de 3 mil anos antes de Cristo (INCA, 2012).

O câncer é uma doença que resulta do crescimento autônomo e desordenado de células que, ao se dividirem em velocidade anormal, desencadeiam o surgimento de tumores ou neoplasias malignas. O tecido neoplásico apresenta uma estrutura celular diferente daqueles dos quais se originou (pleomorfismo, hipercromatismo, dentre outros), e uma capacidade acelerada ao se dividirem (TEIXEIRA, 2009). Esse processo constitui diversos estágios que estão associados aos diferentes eventos moleculares e celulares que são conhecidos, por estar envolvido na transformação de uma célula normal em maligna (ZIECH *et al.*, 2012). Desta maneira por ser uma enfermidade crônica e degenerativa, esse crescimento celular desordenado, pode espalhar-se para outras regiões do corpo (BORGES *et al.*, 2009), acabam por ocasionar transtornos aos pacientes.

Segundo informações da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer a cada ano e estima-se, que até 2020 haverá 16 milhões de novos casos por ano (INCA 2011). Contudo, pode-se dizer que, apesar dos avanços no uso de novas tecnologias e melhoria nas abordagens terapêuticas para o tratamento dessa doença devastadora, dificuldades permanecem, especialmente, as relacionadas ao tratamento de tumores agressivos e ou metastáticos somando à dificuldade em prever melhores respostas aos tratamentos, levando à morbidez e, até, a mortalidade (ESTRADA, 2007; ALHAZZAZI *et al.*, 2011).

Pesquisas indicam que as prováveis causas para o desenvolvimento de tumores malignos podem estar relacionadas com algum grau de instabilidade genética. Os pacientes desenvolvem o CEC devido à anormalidades em diferentes partes das vias de sinalização do ciclo celular. Essa instabilidade pode decorrer de algum tipo de desordem genômica ou de alguma alteração promovida por causas e fatores ambientais, particularmente aqueles relacionados ao estilo de vida de cada indivíduo e que podem ser determinantes tanto para o desenvolvimento de neoplasias, quanto para sua prevenção. Tem sido sugerido que os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer são as substâncias químicas, a

irradiação, os vírus além de aspectos comportamentais, como hábitos alimentares, também relacionados ao meio ambiente (ALVES *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2006; LONGO *et al.*; 2011.;INCA 2011).

Dentre outros fatores, podemos incluir a urbanização, a industrialização, e a exposição freqüente a agentes potencialmente cancerígenos, resultando na formação de radicais livres e, conseqüentemente estresse oxidativo. Esses fatores também contribuem para que o câncer venha assumindo importância cada vez maior entre as causas de morte no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2008; BERGHE, 2012).

3.1.1 CÂNCER DE PELE

A pele representa um dos maiores sistemas de órgãos do corpo humano constituindo cerca de 15% do peso total do corpo (THODY; FRIEDMANN, 1986), agindo como uma barreira contra os efeitos nocivos dos diferentes agentes externos (físicos, químicos e biológicos), tornando-se assim o principal alvo desses agentes.

O câncer de pele representa um conjunto de neoplasias que acomete estruturas dérmicas cutâneas. Os três principais tipos de câncer de pele são o carcinoma de células basais (CCB), o carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide (CEC), que constituem o grupo denominado câncer de pele não melanoma (CPNM), e o melanoma cutâneo (MC) (GREEN *et al.*,2004 ;SOUZA *et al.*, 2009;).

O melanoma origina-se dos melanócitos, células da pele produtoras de um pigmento denominado melanina e é considerado o tipo de câncer de pele mais letal sendo responsável por 75% das mortes de câncer da pele e por 3% de todas as mortes de câncer. Esta neoplasia está diretamente relacionada a exposições intensas e intermitentes ao sol, com formação de queimaduras ou bolhas (OKIDA, 2001; SOUZA *et al.*, 2009; MAUAD *et al.*,2012).

O câncer da pele não melanoma, neoplasia mais comum em caucasianos, apresenta duas variantes histopatológicas: o CCB e o CEC (MAUAD, 2012). O carcinoma de células basais (CCB) é o tipo de câncer mais comum em humanos, acometendo, principalmente, homens maiores de 50 anos de idade. Localiza-se, preferencialmente na região de cabeça (terço superior da face) e pescoço (OKIDA, 2001). Geralmente, o CCB apresenta crescimento lento e baixa agressividade e raramente apresenta metástase, não havendo tratamento específico, tendo como principal abordagem a remoção cirúrgica (GREEN, KHAVARI, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2009).

O carcinoma epidermóide (CEC) é a segunda neoplasia maligna de pele mais comum em todo o mundo, perdendo apenas para o carcinoma basocelular. A sua incidência aumenta após os 40 anos de idade e este tumor é mais comum em homens (FAVALLI, 2007). Segundo as estatísticas da American Cancer Society, a incidência anual de câncer de pele não melanoma nos Estados Unidos é estimado em mais de um milhão de casos e, portanto, é aproximadamente igual a todos os outros casos de malignidades humanas. No Brasil, o CEC também compreende o segundo tipo de câncer de pele mais frequente, responsável por aproximadamente 25% dos casos, e possui maior facilidade em disseminar para os gânglios linfáticos e outros órgãos, levando ao surgimento de metástases (SOUZA, 2009).

Portanto, o câncer de pele é uma doença que apresenta alta prevalência no mundo, representando também, um grave problema de saúde pública sendo sua incidência equivalente a de câncer em todos os outros órgãos (HOUSMAN *et al* 2001), com registro dos mais altos índices na África do Sul e Austrália. A alta prevalência é devido às consequências dos elevados níveis de radiação ultravioleta que se observa nesses países (STAPLES *et al.*, 2006; EMMONS *et al.*, 2011).

Durante as últimas décadas, a incidência crescente de câncer de pele, principalmente, relacionado ao envelhecimento da população e a exposição a grandes quantidades de radiação ultravioleta na superfície da terra, trouxe atenção maior no que diz respeito ao processo pelo qual estes tumores se desenvolvem e como eles podem ser evitados (EINSPAHR *et al* 2001). O câncer de pele é caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado das células que compõem a pele, as quais se dispõem formando camadas (CAMPOS *et al.*, 2011).

A pele está constantemente exposta à radiação ultravioleta (UV), bem como a uma densa camada de poluentes ambientais, tais como componentes da fumaça e do cigarro, que favorecem a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres), somados a exposição excessiva ao sol, particularmente nos primeiros 20 anos de vida (CAMPOS *et al.*; 2011). Tal fenômeno é responsável pela indução das alterações cutâneas (fotoenvelhecimento), nas áreas expostas à radiação UV (EZZEDINE, 2010; KATIYAR, 2010).

Pesquisas têm comprovado que a radiação UV danifica o material genético em resposta à produção de radicais livres. Estes agem interrompendo a comunicação celular modificando a expressão dos genes que em resposta ao estresse enfraquece a resposta imune da pele (RANGARAJAN & ZATS, 2003). Portanto, os raios UV representam os principais agentes etiológicos de queimaduras na pele, envelhecimento precoce e, principalmente, do câncer de pele (ARAUJO & SOUZA, 2008). Nesse sentido, a exposição

contínua a radiação UV, o aumento da expectativa de vida além da mudança de hábitos alimentares e do estilo de vida são os fatores que mais contribuem para o risco crescente das doenças malignas cutâneas (KATIYAR, 2010; YANOFISKY *et al* 2011).

Nesse contexto, pode-se considerar que o diagnóstico precoce do câncer de pele é de importância fundamental, para se obter melhores resultados no tratamento, um prognóstico mais favorável e ainda, a melhoria na qualidade de vida dos pacientes (MAUAD *et al.*, 2012). Assim, cientes de tais fatores e determinantes é possível apresentar novas estratégias de tratamentos que sejam dirigidas as moléculas específicas e as vias de sinalização alteradas nestes tipos de cânceres (GREEN & KHAVARI, 2004).

3.1.2 PROMOTORES DE CâNCER

A proliferação de qualquer célula parenquimatosa ou estroma está intimamente relacionado com os mecanismos fisiológicos finamente orquestrados de controle do ciclo celular. O ciclo celular é composto de 4 estágios – a fase G1 (interfase), onde há um aumento da síntese proteica, preparado-se para a cópia do material genético; a fase S (síntese), havendo duplicação dos cromossomos; a fase G2 (gap 2), preparo para a fase M; e a fase M (mitose), na qual a célula-mãe se divide ao meio, para produzir duas células. Células não ciclantes são consideradas em fase G0, fora do ciclo celular (ALBERTS *et al*, 1994). Portanto, situações onde há um incremento na velocidade do ciclo celular ou no número de células ciclantes, sem um mecanismo regulatório adequado, são potencialmente capazes de induzir a tumorigênese (formação de massas neoplásicas) e carcinogênese (formação de massas neoplásicas malignas ou cânceres) (RIVOIRE *et al* 2001).

O câncer é uma enfermidade decorrente da transformação celular, que resulta do envolvimento e comprometimento das propriedades de crescimento e diferenciação celular, resultando na proliferação descontrolada de células, que invadem os tecidos vizinhos e destroem o parênquima tissular (LONGO *et al*, 2011; INCA 2012).

O processo de formação do câncer ou carcinogênese, em geral, ocorre lentamente, podendo levar alguns anos para que uma célula neoplásica prolifere e dê origem a um tumor clinicamente detectável. Os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos ou carcinógenos são os responsáveis pela iniciação, promoção, progressão ou falta de inibição do tumor. A carcinogênese é determinada pela exposição a esses agentes, em uma dada frequência e período de tempo, e pela interação entre eles (HURSTING, 1999; INCA, 2012).

Os genes que fazem parte da formação de tumores são, principalmente, aqueles envolvidos com o controle do ciclo celular em células normais (proto-oncogenes e antioncogenes), bem como na reparação do DNA danificado e indução da apoptose (genes reguladores da apoptose). Na carcinogênese, as células neoplásicas não se submetem a esse esquema de regulação porque apresentam o DNA danificado e, desta maneira, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular. O câncer, então, é percebido como uma grave situação patológica clínica, gerada por uma neoplasia a qual é classificada como maligna devido à alta agressividade clínica, expressa por um crescimento usualmente rápido e infiltrativo, que desestrutura e destrói o parênquima do órgão ou tecido hospedeiro, além da capacidade de disseminação para órgãos à distância com potencial de emissão de metástases (LOPES *et al.*, 2002; MERLO *et al.*, 2006).

O ciclo celular, base do processo de transformação neoplásica, é controlado por proto-oncogenes e genes supressores de tumor (antioncogenes), que estimulam e inibem a proliferação celular, respectivamente (CESCATO, 2010). Durante o processo cancerígeno, ocorrem mutações, hiperativando proto-oncogenes; estes, então, perdem seus mecanismos regulatórios e tornam-se oncogenes, que são responsáveis pela multiplicação celular excessiva. Em contraste, os genes supressores de tumor contribuem para o desenvolvimento de câncer quando são inativados por mutações ou por alterações epigenéticas. A perda da ação de genes supressores funcionais pode levar a célula ao crescimento desregulado e contínuo, dando origem ao tumor maligno (CHOI & MYERS, 2008).

Nesse sentido, para o crescimento das células tumorais é necessário a perda da ação desses genes, isso pode ocorrer, também, através de um agente iniciador a exemplo das substâncias do grupo dos Hidrocarbonetos Policíclicos e Aromáticos (HPA) que figuram como o grupo de substâncias das mais potentes em oncogênese quimicamente induzida. Os HPA podem ser extraídos de combustíveis fósseis e sobrevivem como produtos de combustão incompleta do carvão mineral, petróleo, tabaco, entre outros. Também podem ocorrer de alguns produtos alimentícios principalmente os defumados (MAINENTI; ROSA, 2008).

Dentre 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). O DMBA é um poluente orgânico largamente liberado no ambiente, especialmente em função da atividade humana e tem apresentado propriedades citotóxicas, mutagênicas e imunossupressoras (LINDHE *et al.*, 2002; BUTERS *et al.*, 2003). Comporta-se experimentalmente como um agente iniciador da carcinogênese (AL-ATTAR, 2004).

Nesse sentido, estudos foram realizados, utilizando experimentos que analisaram o processo de carcinogênese induzida por DMBA, estes, vêm sendo extensivamente publicados na literatura (LINDHE *et al.*, 2002; BUTERS *et al.*, 2003; KAVITCHA; MANOHARAN; 2006). Por ser o DMBA o produto sintético mais utilizado como agente iniciador da carcinogênese experimentalmente induzida, numerosos estudos fazem uso deste produto para indução experimental de câncer nos mais diferentes sítios anatômicos, como mama (COS *et al.*, 2006), boca (KAVITCHA *et al.*, 2006), glândulas salivares (MAINENTI & ROSA, 2008) e pele (CHAUDHARY *et al.*, 2009), entre outros.

Estudos efetuados em roedores indicam que, após exposição ao DMBA, uma variedade de tumores é induzida com elevada frequência. Por ser o DMBA usualmente utilizado como indutor da carcinogênese experimental em camundongos, nesses animais, o epitélio de revestimento é muito mais responsivo aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (WILLIAMS; IATROPOULOS, 2001; BORGES, 2009). O DMBA é capaz de alterar o DNA e causar danos irreversíveis (BOLANHO *et al.*, 2005), sendo a pele e as glândulas mamárias os locais mais previsíveis para o surgimento da carcinogênese (MUQBIL; BANU, 2006)

Investigações relacionadas ao estudo de tumores em modelo animal ganharam um novo impulso ao constatar que estes apresentam alterações genéticas similares às detectadas nos tumores desenvolvidos em humanos (FRAGA *et al.*; 2004 ; YUSPA; GLICK, 2005; QI; XU, 2006). Isto é, a atuação dos carcinógenos age alterando o metabolismo celular, danificando diretamente o DNA e interferindo nos processos biológicos. Além disso, induzem a divisão descontrolada de células que leva à formação de tumores malignos (SENHIL. *et al.*; 2007; MAINENTI & ROSA, 2008).

3.2 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais têm sido largamente empregados pelo homem nas mais variadas formas de uso, sejam eles aplicados a práticas religiosas, em âmbito alimentício, nas crendices populares ou ainda, como curativos no tratamento de diversas doenças (MALVEZZI, 2010). Produtos originários de plantas, minerais ou microorganismos têm sido utilizados para obtenção de compostos medicinais e foram difundidas através do conhecimento popular pela sua possível ação curativa, dando origem ao estudo da atividade biológica de cada espécie utilizada (VEIGA JUNIOR, 2008; BRAZ-FILHO, 2010).

No século XIX, a química experimental propiciou a síntese de novas substâncias orgânicas, sendo este um dos principais fatores determinantes da revolução industrial e

tecnológica. Tal panorama desencadeou a produção acelerada de novos medicamentos à medida que derivados mais puros e concentrados de produtos naturais se tornaram disponíveis. As descobertas sobre os produtos naturais decorrentes da utilização popular e longe do foco de pesquisa da indústria farmacêutica também foram consideradas práticas favoráveis para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, pois forneceram grandes contribuições para o melhor conhecimento dos mecanismos de doenças e drogas (NEWMAN *et al.*, 2003; SAMUELSSON, 2004). A terapêutica ficou pautada no uso de drogas sintéticas e os produtos naturais se limitaram ao uso popular. Desta forma, no século XX, o desenvolvimento de pesquisas para a produção de novos produtos químicos e farmacêuticos possibilitou o controle de doenças como a tuberculose, a sífilis, o câncer, a hanseníase, e as endemias do mundo moderno como a depressão, as cardiopatias e a AIDS (VEIGA JR. *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2008).

Mais recentemente, as técnicas para descoberta de drogas têm sido aplicadas à padronização de medicamentos a base de plantas e produtos da biodiversidade para elucidar compostos marcadores analíticos. A importância das plantas medicinais na descoberta de medicamentos, incluindo compostos isolados a partir desta fonte, envolvendo a descoberta de medicamentos anticâncer e quimiopreventivo proporciona a expansão de inúmeros campos na investigação de diversos e inovadores métodos de análises de plantas medicinais (OBERLIES *et al.*, 2004; BALUNASA & KINGHORN, 2005).

É sabido que populações de países mais pobres fazem uso de plantas medicinais por tradição ou pela ausência de políticas públicas ou pela falta de alternativas econômicas viáveis, enquanto os países mais desenvolvidos fazem uso dos fitomedicamentos por influência do casual consumo de produtos naturais, a exemplo da Alemanha que consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa (BLUMENTAHL, 1998); ainda, os EUA, França, Japão, Portugal, Itália, Coreia do Sul, Reino Unido, Espanha, Suíça e Austrália importam plantas medicinais de estados diversos do Brasil (TOMAZZONI *et al.*, 2006).

Em meio a este contexto, o Brasil, mesmo possuindo uma das maiores florestas do mundo, grande disponibilidade de derivados naturais e biodiversidade, mostra-se inerte quanto ao uso desses produtos naturais na implementação aplicação farmacológica (TOMAZZONI *et al.*, 2006). Contudo, alguns esforços político-sociais empreendem idealizações para incentivo de novas abordagens e práticas terapêuticas que visem à melhoria dos serviços, o aumento da resolutividade e reformulação das abordagens antes preconizadas (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006).

No Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais, além da implantação da fitoterapia como prática oficial

da medicina (BRASIL, 2006). A Portaria nº 971, de 3 de Maio de 2006, reflete essa contestação através da aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde recomendando, através de adoção pelas Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, a implantação e implementação de ações e serviços relativos às Práticas Integrativas e Complementares. Portanto, o uso de produtos naturais deve ser considerado um recurso terapêutico válido que pode incentivar o desenvolvimento comunitário, a integração e a participação social, além do desenvolvimento científico (BRASIL, 2006; BRAZ-FILHO 2010; MALVEZZI 2010).

A utilização de plantas para fins medicinais, tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma prática muito antiga, comumente empregada pela humanidade. A procura por alívio e a expectativa da cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas, pode ter sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JR *et al.*, 2006). Por constituírem uma das fontes mais importantes de novas substâncias diretamente utilizadas como agentes medicinais, os produtos naturais são tidos como padrão de modificações estruturais, por apurarem as propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, para a inspiração de químicos orgânicos, além do incentivo para a construção sintética de novas arquiteturas moleculares naturais (BRAZ FILHO; 2010), porém, estima-se que menos de 15% das plantas foram sistematicamente analisadas quanto à presença de compostos bioativos (PIETERSE *et al.* 2006; MCCHESENEY *et al.*, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca que o conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade é instrumento importante para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). A OMS apóia e estimula a identificação e exploração de terapias da medicina tradicional, por considerar essa prática como essencial aos cuidados primários de saúde (TOMAZZONI *et al.*; 2006). Populações que seguem tais preceitos criam novas expectativas de tratamento de doenças diversas, sendo as plantas medicinais matéria prima essencial para a formulação de medicamentos (PEREIRA *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; CARLINI *et al.*; 2006; AGRA *et al.*, 2007; BIAVATTI *et al.*, 2007).

3.2.1 PRODUTOS NATURAIS NA CARCINOGENESE

Os produtos naturais desempenham um importante papel em pesquisas científicas no tocante à busca de novos fármacos na área da biologia e na química farmacêutica

(BUTLER *et al* 2004; NEUMAN *et al* 2007;). A descoberta de novas substâncias ativas impulsiona os pesquisadores a desenvolverem novas drogas que possibilitem e viabilizem a cura de diversas doenças. Nesse sentido, pode se comprovar que os inúmeros estudos que investigam o potencial anticancerígeno desses produtos naturais, aumentam significativamente (AVCI *et al.*; 2011).

A descoberta de produtos naturais antitumorais em meados dos anos 50 abriu caminho para o avanço exponencial dessa modalidade terapêutica durante quatro décadas posteriores. Pesquisas com agentes citotóxicos em número significativo de moléculas a partir da flora e microrganismos ainda são realizadas para o tratamento em diversos tipos de cânceres (BAILLY, 2009). Muitos desses medicamentos perpetuam, permanecem e ainda são prescritos, podendo esses medicamentos ter se tornado fator chave para a cura ou prolongamento da vida de milhões de pacientes com câncer. Porém no final da década de 1990, o uso de terapêuticas específicas, feitas a partir de receptores de pequenas ou grandes moléculas antitumorais alopática, tornou-se um padrão constante. A partir de então, reduziu-se o potencial das pesquisas relacionadas aos produtos naturais e, conseqüentemente, o uso destes na área da oncologia (CARTER, 1972; THORPE, 2003; BAILLY, 2009).

Nesse contexto, as plantas desempenham um papel importante como efetivos agentes anticâncer, por serem fonte inesgotável de potenciais e novos medicamentos antineoplásicos (MOHAMED AIT- O *et al.*, 2011). Podendo ainda, atribuir à atividade anticâncer dos produtos naturais a presença de diversas substâncias químicas, tais como, lignanas, alcalóides, flavonóides, cumarinas, triterpenoides, quinonas, iridóides, e ácidos graxos insaturados presentes nas plantas medicinais aparentando retardar e, algumas vezes, até inibir o processo de carcinogênese (FUN-YUE; REN-WANG, 2010). Estudos tem tido como finalidade,comprovar que muitos produtos naturais podem servir como agentes potentes de moléculas bioactivas com capacidade de proteger o DNA contra danos oxidativos que induz à carcinogênese, podendo os produtos naturais ter uma potente eficacia comprovada como agentes anti-cancerígenos (ZIECH *et al.*, 2010; LAMSON *et al.*,2010;ZIECH *et al.*, 2012).

Atualmente, estudos abordam a quimioprevenção advinda dos produtos naturais como a promessa que aponta para uma melhoria necessária no controle contra o avanço do câncer de pele não melanoma (CLIFFORD e DIGIOVANNI, 2010). Pesquisas realizadas sobre produtos naturais apresentados como promissores demonstraram ação preventiva positiva durante o desenvolvimento da carcinogênese em modelo roedor, a exemplo dos produtos apícolas (KATIYAR *et al* 2010; KOWALCZYK *et al* 2010; STRATTON *et al* 2010).

Mohamed Ait-O *et al.* (2011) comprovou que o extrato acetônico de *Buxus sempervirens* em seus estudos, mostrou atividade citotóxica em cinco linhas de células cancerígenas da mama. A ação da planta induziu parada do ciclo celular na fase G0/G1 e morte celular por consequência do aumento das células em G1. Esse bloqueio observado pelo extrato acetônico de *Buxus* é motivado pela diminuição da ciclina D1. Tal ação sugeriu que a atividade da planta *Buxus sempervirens* é bastante promissora, desencadeando a morte celular por autofagia e apoptose, sugerindo que a planta pode conter potenciais agentes anticâncer podendo, ser utilizada na terapia do câncer única ou associada contra o câncer de mama.

Outras vertentes científicas também comprovaram o valor efetivo dos produtos naturais na quimioprevenção, como a administração oral do chá verde, rico em polifenóis, que pareceu suprimir o aparecimento dos tumores experimentalmente induzidos em modelos animais (CLIFFORD & DIGIOVANNI, 2010; KATIYAR, 2010).

Por fim, estudos epidemiológicos são exímios em afirmar que o aumento da ingestão de frutas e vegetais na dieta de um indivíduo está associada a um menor risco de desenvolvimento de câncer (GUPTA *et al.*, 1999), incluindo chá e vinho tinto ratificando ainda mais a atuação biológica dos produtos naturais na quimioprevenção (MUKHTAR, 2012). Assim, é possível prever que os produtos naturais, análogos ou combinações destes poderão ser utilizados como agentes quimiopreventivo no futuro (FOLEY, 2009).

3.3 PRODUTOS APÍCOLAS

Os produtos da colméia representam algumas das contribuições mais importantes para a civilização humana e para o desenvolvimento econômico (LEITE & ROCHA, 2005). Atualmente, a utilização e extração destes produtos vêm sendo amplamente difundida. Também nos últimos dez anos é expresso o apoio e incentivos às práticas apícolas em comunidades tradicionais em várias regiões brasileiras (LEITE & ROCHA, 2005; HATSUE-MODRO, 2009). Tal interesse pode incentivar a ampliação de novas fontes de produção desses produtos apícolas, sendo visível um possível interesse na investigação de novas terapias antitumorais que crescem a cada ano (HATSUE-MODRO, 2009).

Destarte, análises atuais também fundamentam aspectos positivos de tais produtos e seus derivados, como atividade antimicrobiana contra bactérias resistentes a antibióticos (MARCUCCI, 1995) e, também, como anticâncer (BANKOVA, 2005), anti-angiogênese e anti-coagulantes além de fatores e agentes cicatrizantes (RATCLIFFE *et al.*, 2011), são bastante utilizados ainda, como antigripais, para curar úlceras, constipações, entre outros (LINS *et al.*, 2003).

Nesse contexto, as abelhas, insetos de importância cultural e homeostase do ciclo natural da fauna e flora, mostram-se detentoras de um vínculo essencial com o ser humano, não apenas pelo uso de larvas e pupas para alimentação, mas também pela oferta de produtos como pólen apícola, mel, própolis, geleia real e cera, utilizados para fins alimentícios, religiosos, cosméticos e medicinais (HATSUE-MODRO *et al.*, 2009).

Em primazia, o mel, produto derivado dos componentes da coméia muito utilizado na nutrição humana e usualmente limitado a sua característica adoçante, constitui-se um alimento de alta qualidade, rico em energia e inúmeras outras substâncias benéficas ao corpo humano e tendo sido empregado pelo homem ao longo do tempo como registro de sua história, com referências em pinturas rupestres e em manuscritos do antigo Egito, Grécia e Roma (PEREIRA *et al.*, 2002; CALDEIRA, 2002). A composição do mel depende da composição do néctar da espécie vegetal produtora e da espécie de abelha que o produz, conferindo-lhe características específicas (ANACLETO *et al.*, 2009). O mel é composto basicamente de carboidratos e é considerado um alimento de alto valor energético para o organismo humano por possuir minerais, proteínas, ácidos orgânicos, vitaminas, hormônios, enzimas e pigmentos vegetais (SOUZA *et al.*, 2004).

O pólen coletado pelas abelhas é resultante de uma mistura de pólen das flores com néctar e substâncias salivares apresentando uma ampla variação em sua composição (LINS *et al.*, 2003). O pólen é armazenado em estruturas que se assemelham a pequenas bolsas, as corbículas (PERIS, 1984). Por ser rico em nutrientes e com alto teor protéico, tem sido utilizado pelo homem durante séculos como alimento principalmente, na medicina popular, onde o seu uso é justificado para aliviar e curar constipações, no tratamento de gripes, úlceras, envelhecimento precoce entre outros (LYNGHEIM *et al.*, 1979; HANSSEN, 1979; CAMPOS *et al.*, 2003). Tais evidências são suportadas pelas atividades biológicas dos principais componentes presentes no pólen apícola, provavelmente, aqueles com propriedades antioxidante, como flavonóides e fenólicos, além de outros componentes (CAMPOS *et al.*, 2003; LINS *et al.*, 2003).

Um outro exemplo dessa versátil aplicabilidade dos derivados apícolas é a Apitoxina. Foco de grandes interrogações científicas, as propriedades curativas de veneno de abelha têm uma tradição muito longa e essa toxina é uma substância complexa que já encontra-se disponível no comércio mundial tendo como aplicação principal a redução de processos inflamatórios provocados por doenças reumáticas (LEITE & ROCHA, 2005; NETO & PACHECO, 2005). Mesmo não sendo totalmente conhecidos, os componentes mais importantes desta mistura de numerosas substâncias parecem ser histamina, lecitinase e hialuronidase (BECK, 1997).

Contudo, mesmo apresentado tais aplicabilidades terapêuticas, a picada de abelha, em certos casos, pode ter efeito tóxico muito forte em humanos. Aproximadamente 0,5 % a 2% da população são hipersensíveis desenvolvendo, então, reação alérgica a picada do inseto, reflexo de uma provável hipersensibilidade à apitoxina (LEITE & ROCHA).

A geléia real, um dos produtos mais importantes para a colméia por servir de alimento para as larvas em desenvolvimento e para a abelha rainha por toda a sua vida, é uma substância viscosa, de coloração brancoamarelada, levemente opalescente, de odor característico e pungente (GARCIA-AMOEDO, 1999 *apud* GARCIA-AMOEDO & ALMEIDA-MURADIAN, 2002). Além disso, a geléia real, também utilizada na alimentação e medicina humana, tem se mostrado importante componente do grupo de produtos apícolas pois inúmeros benefícios foram atribuídos ao seu uso, como o aumento da fertilidade (GARCIA-AMOEDO, 1999), atividade antileucêmica (EVANS *et al.*, 1937), atividade contra tumores ascíticos (TOWNSEND, 1959), atividade antibiótica (BLUM, 1959), e hipocolesterolemiantes (CHO, 1977; GARCIA *et al.*, 2000).

Num todo, a geleia real é composta por umidade, açúcares totais, lipídios, proteínas, aminoácidos, cinzas, minerais (ferro e cálcio) e vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina), que são responsáveis diretos pelas atividades apresentadas, tais como aumento de fertilidade, atividade antileucêmica e contra tumores ascíticos, atividade antibiótica e hipocolesterolemiantes (EVANS *et al.*, 1937; TOWNSEND *et al.* 1959; BLUM *et al.*, 1959; CHO, 1977; GARCIA-AMOEDO & ALMEIDA-MURADIAN, 2002).

A cera de abelha, outro importante representante dos produtos da colméia, está ligada à história dos povos, havendo fortes evidências da importância dos produtos desses insetos como fonte de alimento para as populações humanas e uso medicinal, na prevenção de doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos (SOUZA *et al.*, 2004; SAMPAIO *et al.*, 2009). Este produto se configura como uma substância secretada pelas abelhas através de quatro pares de glândulas serígenas, localizadas na parte inferior do abdômen. Mesmo de produção escassa, requerendo uma média de 10 kg de mel para cada 1 kg de cera, tem contribuído de maneira satisfatória sendo utilizada até para a determinação da densidade do solo (SILVA *et al.*, 2003; SAMPAIO *et al.*, 2009).

Ainda, dentre os produtos apícolas, a própolis destaca-se tanto pelas suas propriedades terapêuticas conferidas, conferidas em função de suas atividades biológicas, a exemplo das propriedades antimicrobiana (SAWAYA, 2004; ALENCAR 2007), antiinflamatória (SFORCIN *et al.*, 2000), cicatrizante (DAUGSCH *et al.*, 2007) analgésica (PAULINO *et al.*, 2003); quanto pela possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia, na forma de alimentos funcionais (PARK, 1995; AGUERO *et al.*, 2010).

3.3.1 PRÓPOLIS

A própolis é uma resina natural e balsâmica, de consistência viscosa e cor variada, produzida por abelhas do gênero *Apis* e utilizada para esterilizar, vedar e impermeabilizar suas colméias, protegendo-as de possíveis invasores (KHALIL *et al.*, 2006). Além disso, constitui uma mistura complexa de substâncias gomosas colhidas de brotos, flores e exsudato de plantas, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (MAIA-ARAUJO *et al.*, 2011). A composição química da própolis difere significativamente, sendo sua origem de acordo com sua posição geográfica e botânica, principalmente porque as abelhas coletam resinas das plantas e exsudados a partir de fontes disponíveis, que variam de uma região para outra, dependendo dos fatores climáticos, do solo, dentre outros. Isto é, a própolis muda em composição sazonalmente em uma mesma localidade (MENEZES, 2005; AGUERO *et al.*, 2010).

Devido à grande variedade na composição química e atividades biológicas - mais de duzentas substâncias já foram encontradas - atualmente, a própolis também é amplamente utilizada em alimentos e bebidas com o objetivo de melhorar a saúde e evitar as doenças (MARCUCCI, 1995; BURDOCK 1998). Mesmo assim, as substâncias listadas podem não estar presentes em todas as amostras de própolis, determinando-as apenas como coletâneas das substâncias. A própolis brasileira, a exemplo, apresentou 29 compostos bioativos isolados (CASTRO, 2001).

Os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, alcoóis, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteróides, cetonas, chalconas e di-hidrochalconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais (MENEZES, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2011).

Além disso, a própolis apresenta características variadas, a depender das estações do ano e da sua origem botânica, incluído em sua composição 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de pólen e 5% de outras substâncias (MAIA-ARAUJO, 2009). Sua coloração varia entre o amarelo esverdeado e marrom escuro possuindo diferenças na sua composição química de acordo com a sua origem, idade e época de colheita (BANKOVA *et al.*, 2000).

Segundo estudos realizados por Park *et al* (2000), a própolis de origem brasileira foi categorizada em doze tipos distintos baseados na coloração e aparência dos extratos; tais

variantes apresentam propriedades biológicas específicas já comprovadas (ALENCAR et al., 2007). Atualmente, outro tipo de própolis tem sido descrita e pesquisada – a própolis vermelha. Esse tipo de própolis é coletada nas regiões do nordeste brasileiro, porém relatos confirmam ser um fenótipo típico da região de Cuba (ARAUJO & MARCUCCI, 2011).

As propriedades biológicas e farmacológicas da própolis estão diretamente ligadas à sua composição química (ADELMANN, 2005). A presença de flavonóides na composição da própolis, por exemplo, atribui às mesmas ações biológicas como: efeito antimicrobiano (SAWAYA 2004), antimicótico (CABRAL et al 2009), imunomodulador (AVCI et al, 2011), cicatrizante e antioxidante (DAUGSCH et al., 2007; ALENCAR et al., 2007). Estes polifenóis mostram 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).

Segundo Avci et al.(2011), o ácido caféico éster fenetil (CAPE), um produto químico e estrutural de flavonóides também encontrado na própolis, apresenta comprovadamente atividade antiviral (AMOROS et al., 1992), antiinflamatória (SFORCIN et al, 2000), imunomoduladora (SFORCIN et al, 2000), e efeitos antiproliferativos em diferentes condições. Podendo, ainda, ser comprovada a capacidade antiproliferativa dos CAPE que é considerado como um novo tratamento antineoplásico (DEMESTRE et al. 2009).

3.3.2 PRÓPOLIS VERDE

A própolis apresenta composição química dependente da flora da região onde é produzida e da época do ano em que é coletada (NASCIMENTO et al., 2008; CAVALCANTE et al., 2011).

Nesse contexto de variantes, destaca-se a própolis brasileira produzida no cerrado, rica em derivados prenilados do ácido-p-cumárico (BANKOVA; MARCUCCI, 1999). Tal variante 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; PEREIRA et al., 2008).

Também conhecida como própolis derivada do arbusto alecrim-do-campo, a própolis verde é produzida dos ápices vegetativos desta planta (*Baccharis dracunculifolia*) e

altamente valorizada no mercado internacional, sendo que, somente no Japão, movimentava um mercado da ordem de setecentos milhões de dólares ao ano (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Os principais constituintes já encontrados na própolis do “alecrim” foram o ácido cinâmico e derivados, flavonóides, ácido benzóico, alguns benzoatos, hidroxilados não aromáticos, ácidos alifáticos e ésteres (PINTO *et al.*, 2011).

Fundamentalmente produzida no sul, leste, centro e zona da mata de Minas Gerais, leste de São Paulo, norte do Paraná e em regiões serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro; a própolis verde se mostrou altamente eficaz no combate a uma série de microrganismos patógenos (Park *et al.*, 2000; Marcucci *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2008). Adicionalmente, Cavalcante *et al.* (2011) constatou o papel quimiopreventivo da própolis verde na carcinogênese quimicamente induzida em língua estando esse resultado associado diretamente com o aumento da concentração da própolis nos extratos hidroalcoólicos administrados oralmente.

Apesar do uso de própolis verde brasileira na medicina popular e de seu amplo espectro de atividades biológicas, Bankova *et al.* (2000) alertam para uma ação citotóxica da própolis brasileira, o que é atribuído aos derivados de benzofurano. Outro exemplo desta situação foi refletido nos resultados dos estudos toxicológicos da própolis verde *in vitro* revelando que baixas concentrações mostram efeitos antimutagenicos, enquanto em altas concentrações resultam em efeitos mutagênicos (PEREIRA *et al.*, 2008). Contudo, segundo ensaios biológicos realizados por Reis *et al.* (2000), a própolis quando utilizada numa dose de até 650 mg/kg de peso não interfere de modo significativo sob o trato gastrointestinal ou provocando alterações à nível hematológico, demonstrando uma relativa baixa toxicidade nas concentrações usuais.

3.3.3 PRÓPOLIS E ATIVIDADE ANTITUMORAL

A atividade antineoplásica da própolis está relacionada a um provável potencial antiproliferativo. Li *et al.*, (2007) demonstraram que Extratos Etanólicos da Própolis (EEP) inibem o crescimento de células neoplásicas de tumores prostáticos humanos, e evidenciaram, ainda, que tal atividade biológica estava relacionada a inibição de oncoproteínas envolvidas no ciclo celular, como ciclina D1 e proteína p21, e concluíram que este produto natural teria amplo potencial não apenas como quimioterápico, mas também como quimioprotetores contra cânceres de próstata.

Ohta *et al.*, (2008) relataram que EEP inibem a carcinogênese tumoral *in vivo* e *in vitro* através da indução de apoptose das células endoteliais em neoformação, indicando que o potencial antineoplásico induzido por apoptose associado à própolis é também um efeito indireto.

A atividade antiproliferativa da própolis está associada a diferentes compostos químicos. Foi demonstrado, através de ensaios com células tumorais pancreáticas, que ésteres de ácido cafeico, um constituinte químico amplamente encontrado na variedade verde da própolis brasileira, traz elevado potencial para indução de apoptose em clones malignos. Os autores relacionam esta atividade biológica à promoção da disfunção mitocondrial acompanhada da ativação das caspase 3 e 7 (CHEN *et al.*, 2008).

Messerli *et al* (2009), demonstraram que a artepilina C extraída da variedade verde da própolis brasileira é capaz de inibir a síntese de proteínas quinases associadas à proliferação celular (PAK I), promovendo supressão do crescimento tumoral de neurofibromas experimentalmente induzidos, confirmando o potencial antineoplásico deste produto natural.

Em estudos pioneiros, Orsolic *et al.* (2004) demonstraram que compostos hidrossolúveis de própolis, como o ácido caféico, o éster feniletil do ácido caféico (CAPE) e a quercetina poderiam ter relação direta no controle do crescimento tumoral em modelos experimentais. Também em estudos afins mais recentes, pôde-se sugerir que o CAPE, um dos componentes ativos da própolis, parece ter um potencial quimioterapêutico no tratamento da leucemia linfoblástica aguda em humanos, através da indução de apoptose celular (AVCI *et al.*; 2011).

Além disso, outros efeitos antineoplásicos da própolis ou seus constituintes também são reportados. Uma substancial atividade inibitória da expressão de metaloproteinases em células neoplásicas malignas são evidenciadas em alguns estudos (HWANG *et al*, 2006; LEE *et al.*, 2008). Os autores sugerem que extratos de própolis poderiam ter um papel importante no controle de cânceres já instalados por meio da supressão da invasão e redução do potencial metastático tumoral, fenômenos patológicos intimamente associados à hiperexpressão dessas enzimas proteolíticas.

4. REFERÊNCIAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140, 2007.

AGUERO, M. B.; GONZALEZ, M.; LIMA, B.; SVETAZ, L.; SANCHEZ, M.; ZACCHINO, S.; FERESIN, G. E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PALERMO, J.; WUNDERLIN, D.; TAPIA, A.; Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav.(Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity; *J. Agric. Food Chem.*, 58, 194–20, 2010.

AIT-MOHAMED, O.; BATTISTI, V.; JOLIOT, V.; FRITSCH, L.; PONTIS, J.; MEDJKANE, S.; REDEUILH, C.; LAMOURI, A.; FAHY, C.; RHOLAM, M.; ATMANI, D.; AIT-SI-ALI, S. Acetonic Extract of *Buxus sempervirens* Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer; *PLoS ONE* 6(9): e24537., 2011.

AL-ATTAR, A. M. The Influence of Dietary Grapeseed Oil on DMBA-Induced Liver Enzymes Disturbance in the Frog, *Rana ridibunda*. *Pakistan J Nut*; 3 (5): 304-309, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Molecular biology of the cell*. 3th ed. New York: Garland, 1994:863-910, 1994.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRA, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKID, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis, J Ethnopharmacol. 5;113(2):278-83, 2007.

ALHAZZAZI, T. Y.; KAMARAJAN, P.; VERDIN, E.; KAPILA, Y. L. SIRT3 and cancer: tumor promoter or suppressor?. Biochim Biophys Acta, Ago ;1816(1):80-8, 2011.

ALMEIDA, A. C. C.; YAMASHITA, T.; CONTE, B.; MATTOS, A. C.; VERÍSSIMO, R. P.; FERREIRA, M. C. F. Frequência do carcinoma basocelular na população menor de 50 anos: estudo do serviço e revisão de literatura. An Bras Dermatol. 84(6):692-4, 2009.

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 19(4): 406-414, 2004.

AMOROS, M., SAUVAGER, F., GIRRE, L. e CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*. 23: 231-240, 1992.

GARCIA-AMOEDO, L. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real Quim. Nov. 25(4): 676-679, 2002.

ARAUJO, T. S.; SOUZA, S. O. de, Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. Scientia Plena. 4(11): 1-7, 2008.

ARAÚJO, K. C. S; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. RPIF, Rev. Pesq. Inov. Farm. 3(1), 9-14, 2011.

AVCI, C. B.; GUNDUZ, C.; BARAN, Y.; SAHIN, F. YILMAZ, S.; DOGAN, Z. O.; SAYDAM, G.; Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells; J Cancer Res Clin Oncol 137:41–47, 2011.

BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. Biochem Pharmacol. May 1;77(9):1447-57, 2009.

BALUNASA, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants, V. 78, Issue 5. 22: 431–441, 2005.

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

BANKOVA, V.S. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Journal of Ethnopharmacology. 100:114-117, 2005.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. Rev Bras Farmacogn. 16: 258-285, 2006.

BECK, B.F. The bible of bee venom therapy: bee venom, its nature, and its effect on arthritic and rheumatoid conditions. New York: Health Resources Press, 1997. 260p.

BERGHE, W. V. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes. Pharmacological Research. 65: 565– 576, 2012.

BLAVATTI, M. W.; MARENSI, V.; LEITE, S. N.; REIS A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn* 17: 640-653, 2007.

BLUMENTAHL, M. The Complete German Commission e Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin: American Botanical Council, 1998.

BOLANHO, A.; CARMO, E. D.; SOUSA, F. A. C.; CARVALHO, G. R.; ROSA, L. E. B.; Descrição da metodologia utilizada no estudo da carcinogênese induzida pelo DMBA em língua de hamster, *Revista de Odontologia da UNESP*. 2005; 34(3): 129-133, 2005.

BORGES, D. M. L.; SENA, M. F.; FERREIRA, M. A. F.; RONCALLI, A. G. Mortalidade por câncer de boca e condição sócio-econômica no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 25(2): 321-327. 2009.

BLUM, M. S.; NOVAK, A. F.; TABER, S. 10-hydroxy-delta 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science*. 130(3373):452–453, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Publicado no portal do Ministério da Saúde do Brasil: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf. Acessado em 15 de março de 2012.

BRAZ FILHO; R.; Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente; *Quim. Nova*. 33(1): 229-239, 2010.

BURDOCK, G. A., “Review of the biological properties and toxicity of bee propolis,” *Food and Chemical Toxicology*. 36(4): 347–363, 1998.

BUTERS, J. L.; QUINTANILLA-MARTINEZ, W.; SCHOBBER, V. J.; SOBALLA, J.; HINTERMAIR, T.; WOLFF, F. J.; GONZALEZ, H. G. CYP1B1 determines susceptibility to low doses of 7,12-dimethylbenz [a] anthracene-induced ovarian cancers in mice: correlation of CYP1B1-mediated DNA adducts with carcinogenicity. *Carcinogenesis*. 24: 327-334, 2003.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim. Nova*, 32(6): 1523-7, 2009.

CALDEIRA, J. John's beekeeping notebook - American beekeeping history: the bee hive. Disponível em <http://outdoorplace.org/beekeeping/history1.htm>. Acesso em: 11 set. 2002.

CAMPOS, E. C. R.; SIMÕES, J. C.; KAMEI, D. J.; SANTOS, F. M. R.; PINHEIRO, E. B. A.; BALDISSERA, R. L.; Análise do perfil epidemiológico, clínico e patológico de pacientes portadores de câncer de pele não melanoma tratados no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. *Rev. Med. Res.*; 13 (4): 251-260, 2011.

CARLINI, E. A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Rev Bras Farmacogn* 16: 690-695, 2006.

CARTER, S. K.; FRIEDMAN, M. A. 5-(3,3-Dimethyl-1-triazeno) - imidazole-4-carboxamide (DTIC, DIC, NSC-45388) - a new antitumor agent with activity against malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1972;8:85–92, 1972.

CASTRO, S. L. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this Bee product. *Annual Review of Biomedl Sci*. 3: 49-83, 2001.

CAVALCANTE, D. R. R.; OLIVEIRA, P. S.; GÓIS, S. M.; SOARES, A. F.; CARDOSO, J. C.; PADILHA F. F.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 77(3):278-84, 2011.

CESCATO, 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.* 31(85): 196-205, 2009.

CHEN, C.; WU, C.; LAI, Y.; LEE, W.; CHE, H.; CHEN, R.; CHEN, L.; HO, Y.; WANG, Y. NF-B-activated tissue transglutaminase is involved in ethanol-induced hepatic injury and the possible role of propolis in preventing fibrogenesis. *Toxicology.* 246(2-3): 148–157, 2008.

CHO, Y. T. Studies on royal jelly and abnormal cholesterol and triglycerides. *Am Bee J.* 117:36–9, 1977.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res Jan*; 87(1):14-32,2008. Review. Erratum *J Dent Feb*;87(2):191, Res, 2008.

CLIFFORD, J. L.; DIGIOVANNI, J. The Promise of Natural Products for Blocking Early Events in Skin Carcinogenesis. *Cancer Prev Res*; 3(2):131-135, 2010.

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*. 15(118):, p. 274-8, 2006.

COX, B.; SNEYD, M. J. A regional non-melanoma skin cancer (NMSC) collection as part of the National Cancer Registry. *N Z Med J*. Nov 25.124(1346):101-2, 2011.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents (dagger). *Chem Rev*. 109(7):3012-43, 2009.

CRANE, E. 1985. O livro do mel. São Paulo: Nobel. 226p.

DAUGSCH, 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.

DEMESTRE M. ; MESSERLI S. M. ; CELLI3 N. ; CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)-based Propolis Extract (Bio 30) Suppresses the Growth of Human Neurofibromatosis (NF) Tumor Xenografts in Mice. *Phytother Res*. 23(2):226-30, 2008.

EMMONS, K. M.;GELLER, A. C.; PULEO E.; SAVADATTI, S. S.; HU,S. W.; GORHAM, S.; WERCHNIAK, A. E., Skin Cancer Screening Group. Skin cancer education and early detection at the beach: a randomized trial of dermatologist examination and biometric feedback. *J Am Acad Dermatol*. 64(2):282-289, 2011.

EINSPAHR, J. G.; ALBERTS, D. S.; WARNEKE, J. A.; BOZZO, P.; BASYE, J.; GROGAN, T. M. Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis. *Neoplasia*. Nov 1(5):468-75, 2001.

EVANS, H. M., G. A, EMERSON & J. E, ECKERT Alleged vitamin E content in royal jelly. *J. Econ. Ent.*, 30: 642-6, 1937.

EZZEDINE, K.; LATREILLE, J.; KESSE-GUYOT, E.; GALAN, P.; HERCBERG, S.; GUINOT, C.; MALVY, D. Incidence of skin cancers during 5-year follow-up after stopping antioxidant vitamins and mineral supplementation: *Eur J Cancer* 46(18):3316-22, 2010.

FAVALLI, P.; BERGONSI, T. O.; PAVANELLO, D. P.; ORSI, V.; PASE, P.; SCHIMIDT, M.; SILVA, J. B.; Cutaneous epidermoid carcinoma: clinical-pathological and social aspects, *Rev AMRIGS*. 51 (4): 301-305, out.-dez. 2007.

FOLEY, D. *Anticancer Therapeutics*. Edited by Sotiris Missailidis. *Chem Med Chem*, 4(7): 1203-1216, 2009.

FRAGA, M. F. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res*. 64 (16): 5527-5534, 2004.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S.; *Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais*; *Rev Bras Enferm*, Brasília; 61(2): 201-8 2008.

FU-YUE, D.; REN-WANG, J. Research Progress of the Natural Products against Prostate Cancer; *Chin J Nat Med Mar*. 9(2): 81-89, 2011.

GARCIA, R. C.; SOUZA, D. T. M; COUTO, R. H. N. Cúpulas comerciais para produção de geléia real e rainhas em colméias de abelhas *Apis mellifera*. Scientia Agricola, 57(2): 367-370, 2000.

GREEN, C.L.; KHAVARI, P.A. Targets for molecular therapy of skin cancer Seminars in Cancer Biology 14: 63–69, 2004.

GUPTA, S.; AHMAD, N.; MOHAN, R .R.; HUSAIN, M .M.; MUKHTAR, H.; Prostate cancer chemoprevention by green tea: in vitro and in vivo inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase, Cancer Research 59: 2115–2120,1999.

HATSUE MODRO, A. F.; SOUZA, S.; HIROSHI ABURAYA, F.; MAIA, E. Conhecimento dos moradores do médio Araguaia, Estado do Mato Grosso, sobre a utilidade de produtos de abelhas (Hymenoptera, Apidae). Acta Sci Biol Sci. 31(4): 421-424, 2009.

HOUSMAN, T. S.; FELDMAN, S. R; WILLIFORD, P. M.; JR-FLEISCHER, A. B.; GOLDMAN, N. D.; ACOSTAMADIEDO, J. M.; CHEN, G. J. Skin cancer is among the most costly of all cancers to treat for the Medicare population. J Am Acad Dermatol. Mar 48(3):425-9, 2003.

HURSTING, S.D.; SLAGA, T. J.; FISCHER, S.M.; DIGIOVANNI, J.; PHANG, J. M. Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. J Natl Cancer Inst.; 91(3):215-25, 1999

HWANG, H. J.; PARK, H. J.; CHUNG, H. J.; MIN, H. Y.; PARK, E. J.; HONG, J. Y.; LEE, S. K.; Inhibitory EFFECTS of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. J Nutr Biochem. May;17(5):356-62, 2006.

KATIYAR, S. K. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. Arch Biochem Biophys. Apr 15; 508(2):152-8, 2011.

KAUR, J.; SHARMA, M.; SHARMA, P.D.; BANSAL M.P.. Antitumor Activity of Lantadenes in DMBA/TPA Induced Skin Tumors in Mice: Expression of Transcription Factors. Am. J. Biomed. Sci. 2(1), 79-90, 2010.

KAVITCHA, 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, 38(3): 185-89, 2006.

KHALIL, M.L. Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pac J Cancer Prev. Jan-Mar. 7(1):22-31, 2006

LEE, K. W.; KANG, N. J.; KIM, J. H.; LEE, K. M.; LEE, D. E.; HUR, H. J; LEE. H. J.; Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B Genes Nutr. Feb. 2(4):319-22, 2008.

LEITE, G. L. D.; ROCHA, S. L.; Apitoxina. Unimontes Cient. 7(1):115 – 125, 2005.

LIH, K. 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. 31(3):601-6, 2007.

LINDHE, R.; GRANBERG, L.; BRANDT, I. Target cells for cytochrome P450-catalysed irreversible binding of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in rodent adrenal glands. Arch. Toxicol., 76: 460-466, 2002.

LINS, A. C. S.; SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A.; SILVA, E.M.S.; FREITAS, B.M. Flavonóides isolados do pólen coletado pela abelha *Scaptotrigona bipunctata* (CANUDO); Rev. Bras. Farmacogn. 13(2):40-1, 2003.

LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; AZEVEDO, R. B. Oral cancer and photodynamic therapy as a treatment. RGO - Rev Gaúcha Odontol. 59(suppl 0): 51-57, 2011.

LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO C. B. C.; Principais genes que participam da formação de tumores. Rev Biol Cienc Terra. 2(2):1-7, 2002.

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), 2009.

MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C.; Araujo, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha. Scientia Plena. 7(4): 1-4, 2011.

MAINENTI, P.; ROSA, LEB.; Carcinogênese química experimental em glândulas salivares: revisão da literatura. Rev Brás Cancerol. 54(2): 167-174, 2008.

MALVEZZI, C. K. Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações. Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2010.

MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 26(2): 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Quim. Nov., 19(5): 529-535, 1996.

MARTINS, I. L.; ALVES, C. S.; COSTA, P. M. C.; MENDONÇA, V. L. M. Perfil do câncer de pele em pacientes do instituto do câncer do Ceara no período de 2000 a 2003. Revista Brasileira em promoção de saúde, ano/vol.20, número 001. Universidade de Fortaleza. Fortaleza, Brasil, 2007.

MAUAD, E. C.; SILVA, T. B.; LATORRE, M. R. D. O.; VIEIRA, R. A. C.; HAIKEL-JR, R. L.; VAZQUEZ, V. L.; LONGATTO-FILHO, A. Opportunistic screening for skin cancer using a mobile unit in Brazil. BMC Dermatology, 11:12, 2011.

MENEZES, H.; Própolis: Uma Revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. Arq. Inst. Biol. 72(3): 405-411, 2005.

MERLO, L. M.F.; PEPPER, J. W.; REID, B. J.; MALEY, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat Rev Cancer.; 6:924-35, 2006.

MESSERLI, S.M.; AHN, M.R.; KUNIMASA, K.; YANAGIHARA, M.; TATEFUJI, T.; HASHIMOTO, K.; MAUTNER, V.; UTO, Y.; HORI H, KUMAZAWA, S.; KAJI, K.; OHTA, T.; MARUTA, H.; ARTEPILLIN, C. (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. Phytother Res. 23(3):423-7, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

MUQBIL, J.; BANU, N. Enhancement of pro-oxidant effect of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in rats by pre-exposure to restraint stress. *Cancer Letters* 240(2):213-20, 2006.

NASCIMENTO, E, A.; CHNG, R.; MORAIS, A. L.; PILO-VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Rev. bras. farmacogn.* 18(3): 379-386, 2008.

NETO, E.M.C.; PACHECO, J.M. Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca, Santa Terezinha, Bahia, Brasil. Disponível em <http://www.biotemas.ufsc.br/pdf/volume181/p113a133.pdf> em 07/08/12.

NEWMAN D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002 *J Nat Prod.* 66(7):1022-37, 2003.

OHTA, T.; KUNIMASA, K.; KOBAYASHI, T.; SAKAMOTO, M.; KAJI, K. Propolis suppresses tumor angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* Sep;72(9):2436-40, 2008.

OKIDA, M.; MADALOSSO, G.; SOUZA, T. L.; SOUZA, C. E. T.; SCAFF, A.; ROMITI, N.; Estudo da prevalência de casos de câncer da pele e análise da eficácia da proteção solar na prevenção de lesões causadas por radiação ultravioleta em uma amostra da população; *An bras Dermatol.* 76(4):403-412, 2001.

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.* 42(5): 385-392, 2006.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A. H.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol.* 94(2-3):307-15, 2004.

PARK, Y.K; KOO, M.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A; ROSALEN, P.L.; ABREU, J.A.S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Cur. Microbiol.*, 36(1):24-8, 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem.* 24;50(9):2502-6, 2002.

PAULINO, N.; DANTAS, A. P.; BANKOVA, V. S.; LONGHI, D. T.; SCREMIN, A.; DE CASTRO, S. L.; CALIXTO, J. B. Bulgarian propolis induces analgesic and antiinflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *Journal of pharmacological sciences.* 93: 307-13, 2003.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. *Rev Bras Farmacogn* 14 (Supl.1): 37-40, 2004.

PEREIRA, A. S; FERNANDO RODRIGUES MATHIAS SILVA SEIXAS, F. R. M. S & AQUINO NETO, F. R. PRÓPOLIS: 100 ANOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro– RJ, *Quim. Nova*, Vol. 25(2): 321-326, 2002.

PEREIRA, A. D.; ANDRADE, S. F.; OLIVEIRA-SWERTS, M. S.; MAISTRO, E. L. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol.* Jul 46(7):2580-4, 2008.

PERIS, J. Producción y comércio de los produtos apícolas en Espãna. El Campo del Banco de Bilbao. *Apicultura*, v.93, 1984.

QI, L.& XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic Med. Chem. Letters*. 16(16): 4243-4245, 2006.

RATCLIFFE, N. A; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; BUTT, T. M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. *Insect Biochem Mol Biol*. 41(10):747-69, 2011.

REIS, C. M. F.; CARVALHO, J. C. T.; CAPUTO, L. R. G.; PATRICIO, K. C .M.; BARBOSA, M. V. J.; CHIEFF, A. L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. *Rev. bras. farmacogn*. 9 -10(1):43-52, 2000.

RIBEIRO, F. L.; JESUS, P. T; MARCUCCI, M. C. Composição química e atividade biológica da própolis tipificada. I JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. UNIBAN, 2008.

RIBEIRO, R.; MARTINS, M. A. T.; FERNANDES, K. P. S.; BUSSADORI, S. K.; MIYAGI, S. P. H.; MARTINS, M. D.; AVALIA ÇÃO DO NÍVEL DE CONHECIMENTO DE UMA POPULAÇÃO ENVOLVEN DO CÂNCER ORAL, *Robrac.*;17(44):104-109, 2008.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. E.; SILVA, I. S. B. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev Bras Canc*. 47(2): 179-84, 2001.

RUSSO, A., LONGO, R. E VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 73 Suppl 1:S21-9.. 2002.

SAMPAIO, J. A.; CASTRO, M. S.; SILVA, F.O. uso da cera de abelhas pelos índios pankararé no raso da catarina, Bahia, Brasil. Arq. Mus. Nac., 67(1-2): 3-12, 2009.

SAMUELSSON, G. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy (5th) Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 2004.

SAWAYA, A. C. H. F.; SOUZA, K. S.; MARCUCCI, M. C.; CUNHA, I. B. S.; SHIMIZU, M. T. Analysis of the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. Braz. J. Microbiol. 35(1-2): 104-109, 2004.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Adv Drug Deliv Rev. 56(10):1467-80, 2004.

SFORCIN, J.M, FERNANDES J.R.A, LOPES, C.A.M., BANKOVA, , FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J Ethnopharmacol, 73: 243-9, 2000.

SILVA, E. M. B.; SILVA, T. J. A.; OLIVEIRA, L. B.; MELO, R. F. JACOMINE, P. K. T. Utilização de cera de abelhas na determinação da densidade do solo. R. Bras. Ci. Solo. 27:955-959, 2003.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE) Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn. 16(4): 455-462, 2006.

SIMÕES, J. C.; GAMA, R. R.; WINHESKI, M. R.; Câncer estadiamento e tratamento. São Paulo: Lemar, p.45-8, 2008.

SZLISZKA, E.; ZENON, P. C.; DOMINO, M.; MAZUR, B.; ZYDOWICZ, G.; KROL, W. Ethanollic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis-Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells. *Molecules* 14(2), 738-754, 2009.

SOUZA, R. C. S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, F. P. M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amaz.* 34(2): 333-6, 2004.

SOUZA, R. J. S. P.; MATTEDI, A. P.; REZENDE, M. L.; CORRÊA, M. P.; DUARTE, E. M. Estimativa do custo do tratamento de câncer de pele tipo melanoma no Estado de São Paulo – Brasil. *An Bras Dermatol.* 84(3):237-43, 2009.

STAPLES, M. P.; ELWOOD, M.; BURTON, R. C.; WILLIAMS, J. L.; MARKS, R.; GILES, G. G. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust.* 184(1):6-10, 2006.

TEIXEIRA, L. C.. Subjective and social implications of mouth cancer: Psychoanalytics considerations. *Arq. bras. psicol.* [online], 14] ; 61(2): 1-12, 2009.

THODY, A.J.; FRIEDMANN, P.S. Functions of the skin. In “Scientific Basis of Dermatology” (A.J. Thody and P.S. Friedmann, Eds.), pp. 1–5. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1986.

THORPE, D. S. Forward & reverse chemical genetics using SPOS-based combinatorial chemistry. *Comb Chem High Throughput Screen.* Nov 6(7):623-47, 2003.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L.; Fitoterapia Popular: a Busca Instrumental Enquanto Prática Terapêutica; Texto Contexto Enferm, Florianópolis; 15(1): 115-21; 2006.

TOWNSEND, G. F.; MORGAN, J. F.; HAZLETT, B. Activity of 10-hydroxydecanoic acid from royal jelly against experimental leukaemia and ascitic tumours. *Nature*. May 2;183(4670):1270-1, 1959.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Nortado Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(2): 308-313, Abr./Jun. 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova* 28(3): 519-528, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, *Rev Bras Farmacogn* 14] ; 15(4): 361-372, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quim. Nova*. 29(2): 326-337, 2006.

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. Chapter 20, 959-1000, 1887p, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publ*. 12(5): 366-70, 2002.

YANOFSKY V. R, MERCER S. E, PHELPS R. G. Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. *J Skin Cancer*. 2011(2011): 210813, 2011;.

YARMEL, D.; RABJOHN, L.; ROBERTS, K.; SOUNDARARAJAN, S. Pedal Squamous Cell Carcinoma in an Immunocompromised Host. J Foot Ankle Surg.. 47(4):343–349, 2008.

YUSPA, S.H.; GLICK, A. B: Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. Semin Cancer Biol. 15(2):75-83, 2005.

ZIECH, D.; ANESTOPOULOS, I.; HANAFI, R.; VOULGARIDOU, G. P.; FRANCO, R.; GEORGAKILAS, A. G.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I.; Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. Cancer Lett. 31;327(1-2):16-25, 2012.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito quimiopreventivo da própolis verde brasileira sobre a carcinogênese dérmica experimental em modelo murino

Rose Nely Pereira-Filho¹, Fellipe Santos Batista², Danielle Rodrigues Ribeiro¹, Cyntia Ferreira Ribeiro², Juliana Batista Melo da Fonte², Allan Ulisses Carvalho de Melo², Margarete Zanardo Gomes¹, Juliana Cordeiro Cardoso¹, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior^{1,2}

RESUMO:

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração oral do Extrato Hidroalcoólico de Própolis verde (EHPV) sobre a carcinogênese dérmica em modelo animal. Para o ensaio biológico, foram usados 36 camundongos, divididos em 6 grupos (n=6): CTR (tratado com 100 mg/kg EHPV e sem indução tumoral), TUM (tratado com água e indução tumoral), GP10 (tratado com 10 mg/kg de EHPV e indução tumoral), GP50 (tratado com 50 mg/kg de EHPV e indução tumoral) e GP100 (tratado com 100 mg/kg de EHPV e indução tumoral). A indução tumoral foi realizada em dias alternados no dorso dos camundongos através da aplicação tópica do DMBA. Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados e a área dorsal foi removida e submetida à análise histológica *post-mortem*. A média de lesões induzidas em TUM (4.14 ± 0.89) foi significativamente maior que em GP10 (2.05 ± 1.02), GP50 (1.8 ± 1.92) e GP100 (2.5 ± 1.73) ($p < 0.05$). Os tumores formados nos grupos tratados com EHPV foram histologicamente mais diferenciado, contudo apenas o grupo PV100 desenvolveu lesões *in situ*. A infiltração de estruturas anatômicas nobres foi menos frequente nos grupos tratados com o EHPV ($p < 0.05$). Esses dados sugerem que a administração oral de EHPV pareceu inibir a carcinogênese dérmica induzida por DMBA, como também pareceu modular a diferenciação e o potencial infiltrativo dos carcinomas em modelo animal

Palavras-chave: DMBA, propolis, câncer de pele.

¹ Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Brasil.

² Faculdade de Odontologia, Universidade Tiradentes, Brasil.

Introduction

A própolis é uma substância resinosa complexa originada a partir da mistura de resinas vegetais e enzimas salivares das abelhas e é coletada a partir de diversas fontes vegetais. A origem botânica e composição química da própolis brasileira já foram analisadas e constatando-se que, dependendo da região, e até mesmo da época, existem algumas diferenças entre os diferentes tipos de própolis (PARK et al. 2002; SAWAYA et al. 2004; SAWAYA et al. 2011; SALOMÃO et al. 2008, TEIXEIRA et al. 2010).

Em relação à composição química da própolis, mais de 200 substâncias podem ser encontradas, incluindo flavonóides, aminoácidos, vitaminas, artepilina C, quercetina, naringenina, resveratrol, galangina, genisteína; compostos polifenólicos, como o ácido caféico (CA) e éster fenético do ácido caféico (CAPE); ácidos cafeoilquínicos e ácidos cinâmicos prenilados, tal como artepilina C e bacarina (MOURA et al. 2011; ORSOLIC et al. 2005; ORSOLIC et al. 2006).

A própolis tem sido utilizada desde a antiguidade como tratamento de diversas doenças na medicina popular. Inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas da própolis, incluindo a atividade antitumoral, foram relatadas durante as últimas décadas (SFORCIN 2007; WATANABE et al. 2011; DAUGSCH et al. 2008; MOURA et al. 2011; ARAUJO et al. 2012).

A quimioprevenção é a área da oncologia que tem como fim a prevenção do câncer através do uso de substâncias naturais e sintéticas. Os agentes quimiopreventivos agem inibindo ou retardando o desenvolvimento neoplásico através do bloqueio da iniciação tumoral, como também atuam prevenindo o desenvolvimento de propriedades invasivas e metastáticas dos tumores desenvolvidos (SZLISZKA et al., 2009).

O grupo de cânceres de pele não-melanoma (CPNM) representam as neoplasias mais comuns em muitos países. O carcinoma de células basais (CCB) e o carcinoma de células escamosas (CEC) são as variantes histopatológicas mais comuns (KIM 2012; CUSTÓDIO et

al. 2010). Dentre os novos compostos terapêuticos anti-câncer, o potencial os produtos naturais vem sendo investigado. Pesquisas *in vivo* e *in vitro* usando extratos de plantas nativas brasileiras tem mostrado resultados promissores (CRAGG et al. 2009; OZI et al. 2011; FERREIRA et al. 2011). Recentemente, demonstrou-se que o EHPV desempenha um papel protetor importante contra a carcinogênese quimicamente induzida na língua de ratos.

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração oral do EHPV da própolis verde brasileira na carcinogênese dérmica em modelo animal.

Material e Métodos

Preceitos Éticos.

Os princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para experimentos em animais foram aplicados nesse estudo. O atual estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Tiradentes (CEP/UNIT nº 231209)

Coleta e obtenção do extrato de própolis

A propolis foi coletada de um apiário na região sudeste (Montes Claros, 16° 44' 06" S 43° 51' 43"). O material foi rotulado e acondicionado em recipientes estéreis refrigerados e armazenados no laboratório. O EHPV foi obtido utilizando o método de Maia-Araújo. Um grama de cada amostra de própolis foi colocado em tubos estéreis com 12.5 mL de Etanol à 70% e foram levados à máquina de ultrassom para extração durante 1 hora. Os extratos foram centrifugados à 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi deixado em fluxo laminar para completa evaporação do solvente e obtenção da massa. O pó resultante foi armazenado em tubos de ensaio estéreis com tampa de rosca, sob refrigeração.

Determinação da concentração de flavonóides

A concentração total de flavonóides foi estabelecida como descrito por Adelman¹⁶. Para isso, 15 a 1000 µL de extrato (concentrações de 5 a 100 mg/mL) foram adicionada em

uma solução contendo 0.1 mL de 10% de nitrato de alumínio e 0.1 mL de acetato de potássio (1 mol/L). O volume final foi completado para 5 mL com Etanol à 80%. As amostras foram homogeneizadas e a absorbância foi mensurada espectrofotometricamente em 415 nm após 40 minutos à temperatura ambiente. A Quercetina, em concentrações de 5 a 50 µg/mL, foi usada para a construção da curva padrão de concentração; os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes a quercetina (mg de quercetina em 100 mg de sólidos totais).

Animais e ensaio biológico

Um total de 36 camundongos *Mus musculus* machos (25-30 g), advindos do Biotério da Universidade Tiradentes (UNIT-SE), foram usados para o desenvolvimento do trabalho. Os animais foram mantidos em gaiolas com maravalha em temperatura controlada (22 °C), ciclo de claro/escuro de 12 horas, água *ad libitum* e dieta padrão com Labina® (Purina, Sao Paulo, Brazil). Após atingir massa corpórea determinada, os animais foram submetidos a procedimentos de indução experimental da carcinogênese química no biotério da instituição. A carcinogênese cutânea foi induzida por aplicação de 100 µL de solução de 9,10 dimetil 1,2-benzantraceno (DMBA, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Um grama do cancerígeno foi diluído em acetona (PA) para obtenção de uma solução a 0,5%. O cancerígeno foi aplicado duas vezes por semana, durante 16 semanas, na pele do dorso dos animais após tricotomia. Os animais foram randomicamente alocados em cinco grupos (n=6), como demonstrado na tabela 1. Uma dose oral do EHPV (administrado por gavagem) foi administrada nos animais dos grupos GP10 (10 mg/kg), GP50 (50 mg/kg), GP100 (100 mg/kg) e CTR (100 mg/kg). Também, 1.0 mL de água destilada foi administrada por gavagem nos animais do grupo TUM. O DMBA à 0.5% foi aplicado sobre o dorso dos camundongos dos grupos PV10, PV50, PV100 e TUM. Água destilada foi aplicada no grupo controle negativo (CTR).

Tabela 1. Distribuição dos animais nos grupos experimentais de acordo com o tratamento

Grupos	Aplicação Tópica	Administração Oral
CTR1	Água destilada	1 mL de 2% tween 80
CTR2	Água destilada	100 mg/Kg EHPV
TUM	DMBA a 0,5 %	1 mL de 2% tween 80
GP10	DMBA a 0,5 %	10 mg/Kg EHPV
GP50	DMBA a 0,5 %	50 mg/Kg EHPV
GP100	DMBA a 0,5 %	100 mg/Kg EHPV

Procedimentos de Gavagem

O extrato seco de própolis verde foi novamente armazenado em suspensão de 10 mg/mL de Tween 80 à 2%. Essa substância foi administrada via oral em dias alternados (em dias diferentes da aplicação do DMBA). A gavagem foi realizada uma semana antes da indução tumoral, com as mesmas doses preconizadas para as 16 semanas do experimento, para verificar possíveis reações adversas ao produto natural, como indicado por Kavitha, Manoharam (2006).

Análise macroscópica das lesões DMBA-induzidas

As lesões induzidas na pele dos animais foram classificadas de acordo com a apresentação clínica: ulcerada, verrucosa ou ulcerada/verrucosa. O volume tumoral (V) foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$V = 4/3. \pi d,$$

Onde:

V= volume;

$\pi = 3.14$;

d = diâmetro médio.

O índice médio de lesões induzidas (In) foi obtido usando a equação:

$$In = \frac{(nL) \times (nA)}{(nT)} \times 100$$

Onde:

In = Índice de lesões DMBA-induzidas;

nL = número de lesões observadas por animal;

nA = número de animais apresentando lesões DMBA-induzidas;

nT = número total de animais por grupo.

Análise histomorfológica das lesões DMBA-induzidas

Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ para remoção *post-mortem* da área tratada, independentemente da presença ou ausência de tumores. As amostras foram fixadas em formol tamponado (10%, pH 7.4) por 24 h, desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico e diafanizadas em xilol para posterior inclusão em parafina. Subsequentemente, cortes de 5µm de espessura foram obtidos e corados em hematoxilina-eosina para análise em microscópio de luz.

Análise da gradação histológica de malignidade dos tumores

O diagnóstico dos tumores epiteliais induzidos nos animais foram classificados de acordo com suas características histológicas, como descrito por Yanofsky et al. (2011), e a gradação histológica de malignidade tumoral foi estabelecido usando os critérios estabelecidos pelas diretrizes de diagnóstico e tratamento de carcinoma de células escamosas cutâneo e lesões precursoras (BONERANDI et al, 2011). Os tumores foram classificados em 4 gradações, baseadas na proporção de células diferenciadas em relação às células não diferenciadas (grau 1 = 3:1, grau 2 = 1:1, grau 3 = 1:3 e grau 4 = nenhuma tendência para diferenciação). Quando a invasão da hipoderme foi notada, a presença ou ausência da infiltração linfática e/ou muscular foram analisadas.

Análise Estatística

O volume tumoral (V) e o índice médio de indução tumoral (InT) nos animais de cada grupo foram expressos em média ± desvio padrão, analisados por análise da variância e o teste *post-hoc* de Tukey. Os outros dados foram expressos em valores absolutos (n) e

freqüência relativa (%), e comparados entre os grupos usando o teste Exato de Fisher. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Resultados

O rendimento do extrato seco da própolis foi de 44.43%. O teor de flavonóide nas amostras de própolis verde foi de $0.95 \pm 0.44\%$. No ensaio biológico, Nenhuma mudança no consumo de comida e de água foi observada nos grupos experimentais. Os animais apresentaram uma ligeira perda de peso corporal nas quatro primeiras semanas do experimento, e, em seguida, mostraram um aumento progressivo até a 16ª semana (Fig. 1). Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos durante o período experimental ($p > 0.05$).

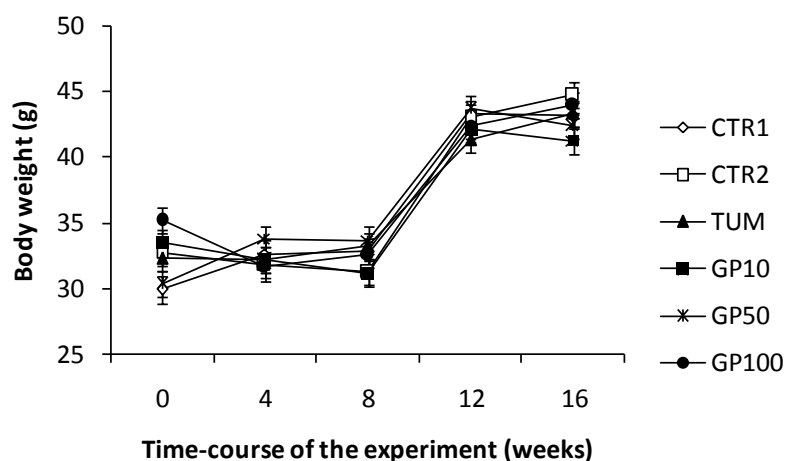


Fig 1. Avaliação do peso corporal dos animais dos grupos experimentais durante o tempo de curso do experimento.

Como demonstrado na Fig. 2, os tumores cutâneos DMBA-induzidos apresentaram-se como múltiplas lesões ulcerativas e exofíticas, com superfície erosiva e leucoplásica. Ambos os grupos controles (CTR1 e CTR2) não apresentaram alterações macroscópicas na estrutura dérmica.

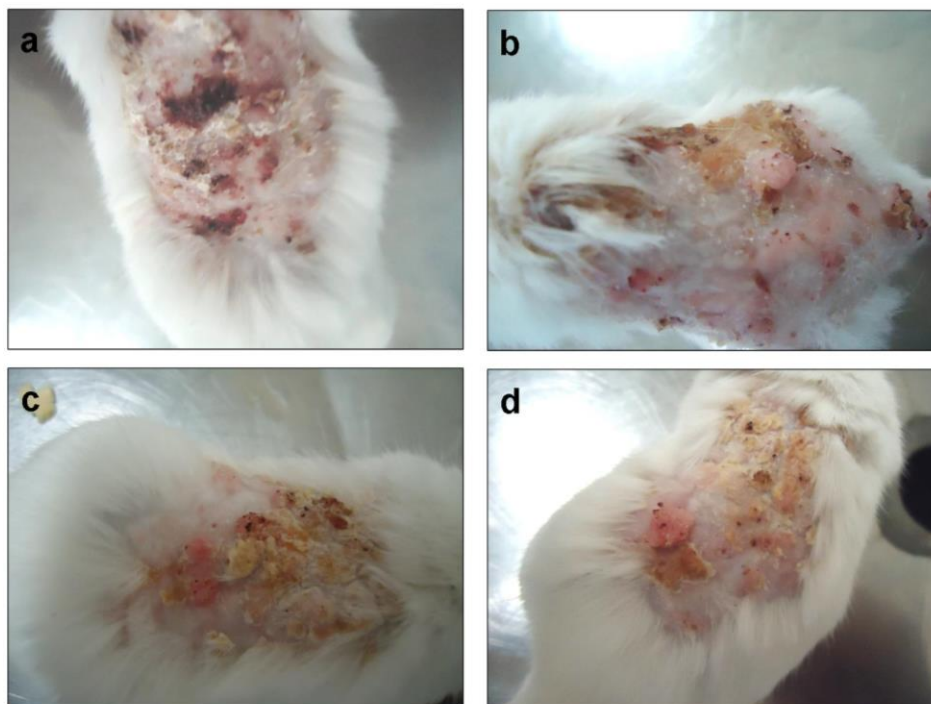


Fig 2. Aparência clínica dos tumores cutâneos DMBA-induzidos. (a) TUM, (b) GP10, (C) GP50 e (d) GP100. Observe o menor número de lesões nos grupos tratados com EHPV.

O índice de lesões induzidas (InT) foi significativamente mais alto no grupo TUM (4.14 ± 0.89) que nos grupos GP10 (2.05 ± 1.02), GP50 (1.80 ± 1.92) e GP100 (2.5 ± 1.73) ($p < 0.05$), porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com EHPV ($p > 0.05$) (Fig. 3A). Com relação ao volume tumoral médio (V) dos tumores quimicamente induzidos, não houve diferença significativa entre os grupos estudados, independente do tratamento com o EHPV ($p > 0.05$).

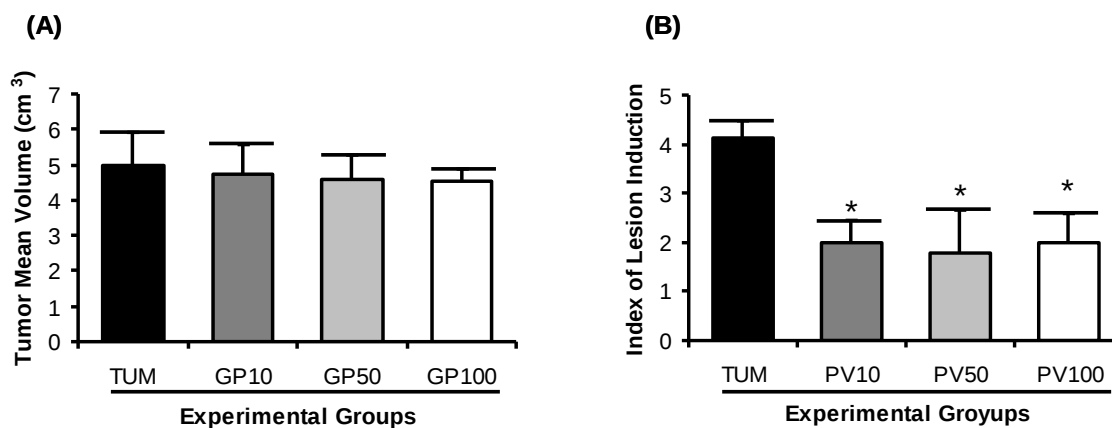


Fig. 3. Análise macroscópica do volume médio tumoral (V) e o índice de lesões induzidas (InT) nos grupos experimentais.

* Significativamente diferente do grupo TUM ($p < 0.05$).

Todos os tumores desenvolvidos neste estudo foram diagnosticados como carcinoma de células escamosas (CEC), com diferentes graus de diferenciação celular. Os grupos controles (CTR1 e CTR2) não exibiram alterações na arquitetura morfológica do tecido dérmico. Como demonstrado na Tabela 2, verificou-se que a maioria dos animais do grupo TUM desenvolveu CEC's pouco diferenciados (grau 3 e 4), enquanto a administração oral do EHPV foi significativamente associado à formação de tumores bem diferenciados (grau 1 e 2) ($p = 0.043$); contudo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com o EHPV ($p > 0.05$).

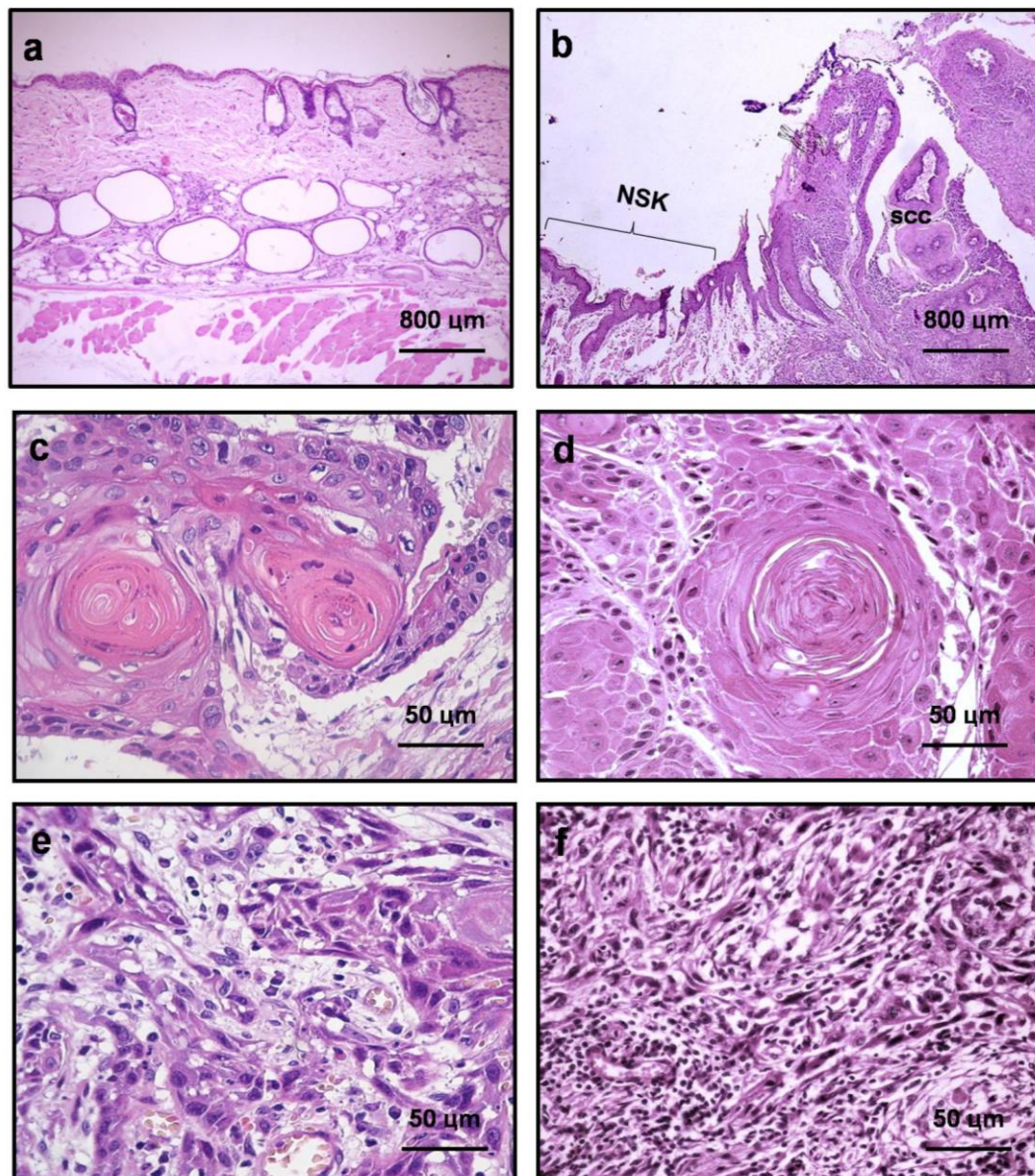


Fig. 4. Análise histológica do tecido dérmico. No grupo controle (a), a arquitetura morfológica normal da pele pode ser observada; ao passo que no grupo TUM (b), o carcinoma de células escamosas (CEC) proveniente da pele normal (NSK) pode ser observado. Os tumores (carcinomas) apresentaram de diferentes graus de malignidade: Grau 1 (c) e grau 2 (d) representam os tumores bem diferenciados, enquanto grau 3 (e) e grau 4 (f) são considerados carcinomas pouco diferenciados (Hematoxilina-Eosina).

Tabela 2. Gradação histológica de malignidade dos carcinomas de células escamosas cutâneos DMBA-induzidos nos grupos experimentais.

Gradação Histológica de Malignidade	Grupos Experimentais			
	TUM n (%)	GP10 n (%)	GP50 n (%)	GP100 n (%)
Grau 1	0	3 (50)	5 (83.33)	4 (66.66)
Grau 2	1 (16.66)	2 (33.33)	1 (16.66)	2 (33.33)
Grau 3	3 (50)	1 (16.66)	0	0
Grau 4	2 (33.33)	0	0	0

Quanto à avaliação histológica da infiltração tumoral em estruturas nobres, foi observado que no grupo TUM, 83.33% dos casos apresentou envolvimento muscular e 66.66% apresentou invasão linfática por células tumorais (Fig. 5). Por outro lado, nos grupos tratados com o EHPV, apenas um caso do grupo GP50 exibiu invasão muscular e linfática (20%). Esta diferença na frequência da infiltração tumoral em estruturas nobres mostrou-se como significativa entre os animais tratados com o EHPV e os animais não tratados com esse extrato ($p < 0.05$).

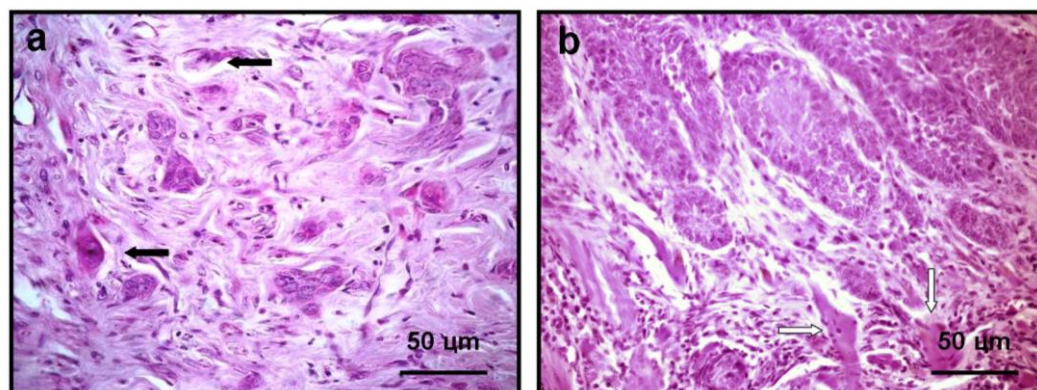


Fig. 5. Evidência histopatológica da infiltração tumoral de estruturas nobres por celular neoplásicas. (a) Células neoplásicas dentro dos vasos linfáticos (setas pretas). (b) Infiltração e intensa dissociação das fibras musculares por celular neoplásicas (setas brancas) (HE, magnificação de 400x).

A resposta inflamatória contra as células neoplásicas, classificadas de leve à intensa, foi observada em todos os tumores cutâneos DMBA-induzidos. Tal reação imunológica foi representada por infiltrado linfocítico permeando ilhas e lençóis tumorais de células

escamosas (Fig. 6). Como demonstrado na Tabela 3, não houve diferença significativa na intensidade da resposta inflamatória independentemente do tratamento com o EHPV ($p>0.05$).

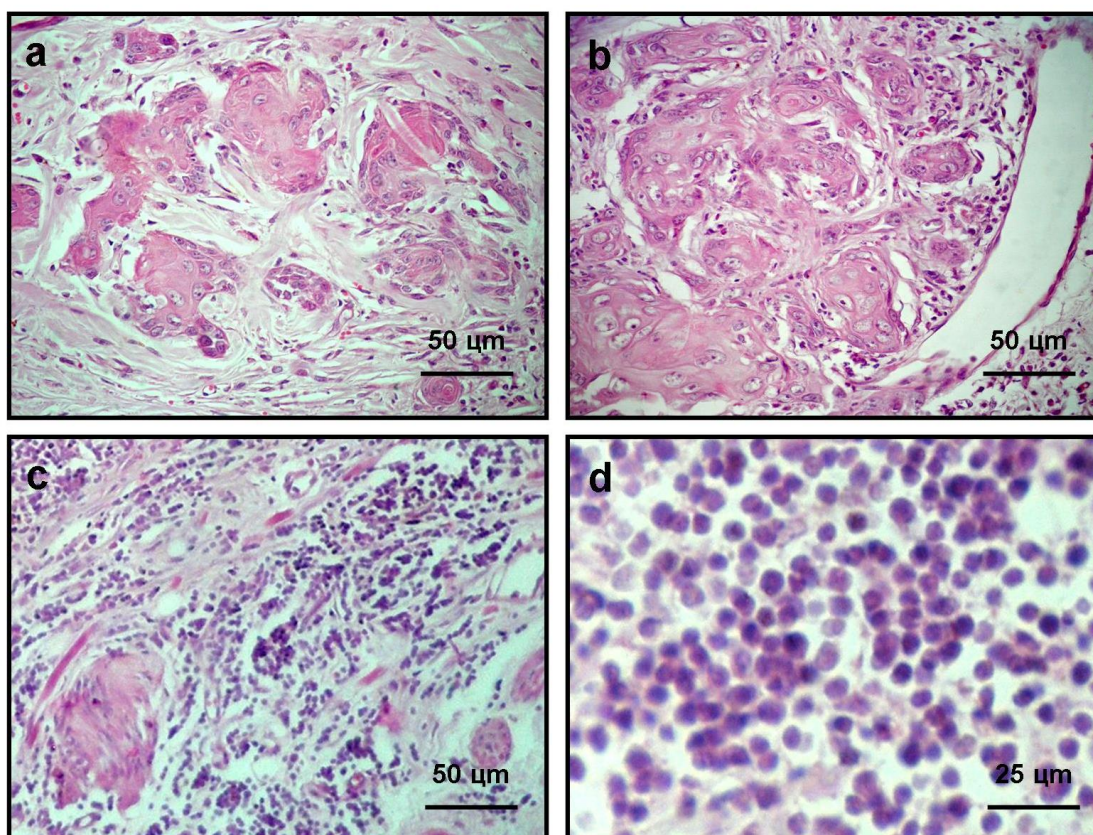


Fig. 6. Padrões histológicos da resposta inflamatória na presença células tumorais invasivas em tecidos dérmicos. (a) Leve, (b) moderado e (c) intenso infiltrado inflamatório, composto por (d) leucócitos com forma arredondada consistente com linfócitos (a/b/c – HE, magnificação de 400X; d – magnificação de 800x).

Tabela 3. Análise histológica da intensidade da resposta inflamatória dos carcinomas de células escamosas nos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Intensidade da resposta inflamatória		
	Leve n (%)	Moderada n (%)	Intensa n (%)
TUM	3 (50.00)	1 (16.66)	2 (33.33)
PG10	1 (16.66)	3 (50.00)	2 (33.33)
PG50	2 (33.33)	3 (50.00)	1 (16.66)
PG100	1 (16.66)	3 (50.00)	2 (33.33)

Discussão

A carcinogênese é composta por diversos estágios incluindo a iniciação, promoção e progressão. Pesquisas tem sido realizadas primando a descoberta de compostos naturais ou sintéticos que poderiam prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese. A própolis tem sido considerada como um dos mais promissores produtos usados na quimioprevenção (ORSOLIC et al. 2005, PADMAVATHI et al. 2006).

Neste estudo, a administração oral do EHPV não induziu alterações significativas na ingestão de água e comida dos animais durante o experimento. Porém, houve uma ligeira perda de peso do corporal até a quarta semana, situação essa invertida ao longo do tempo experimental. Essa perda está provavelmente relacionada a um período de adaptação, quando maiores níveis de estresse foram provocados nos animais como um resultado da manipulação experimental. Uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos, é possível sugerir que a administração oral do EHPV não exerceu influência no padrão de alimentação e peso corporal dos animais.

Foi demonstrado que administração oral de EHPV promoveu inibição do crescimento dos tumores epiteliais DMBA-induzidos nos camundongos. Contudo, uma vez que não há diferença entre os grupos tratados com o EHPV, pode-se sugerir que esse efeito não é dose-dependente. A atividade antitumoral da própolis brasileira também tem sido comprovados em outros estudos (SZLISZKA et al. 2011; CAVALCANTE et al. 2011; FRANCHI Jr. et al. 2012).

Uma hipótese para explicar estes resultados seria a ação do EHPV através da inibição da síntese de óxido nítrico que facilita o rápido crescimento do tumor (ARAÚJO et al. 2010). Outra explanação pertinente é que o ester fenetílico do caféico (CAPE), um derivado do ácido caféico, e outro substância antitumoral chamada ARC (artepelina C) inativa a PAK1 que é um dos principais responsáveis pelo crescimento tumoral (ORSOLIC et al. 2005; SZLISZKA et

al. 2011; DEMESTRE et al. 2010; KORISH et al. 2011; MESSERLI et al. 2009; WU et al. 2011).

Outro mecanismo biológico associado com a atividade antitumoral do extrato da própolis tem sido descrito. Tem sido relatado que o extrato hidroalcoólico da própolis verde brasileira é capaz de inibir o processo de angiogênese através do bloqueio da ERK1/2, proteína de sinalização anti-apoptótica em células endoteliais (KUNIMASA et al., 2011).

Nesta pesquisa, o volume tumoral médio das lesões quimicamente induzidas não foi significativamente diferente entre os grupos. Estes dados sugerem que apesar de ter um potencial efeito inibitório sobre a indução tumoral, a administração do EHPV não afetou a taxa crescimento dos tumores epiteliais uma vez que a fase de promoção/progressão da carcinogênese tem sido iniciada.

Além disso, a administração oral do EHPV pareceu afetar o padrão da diferenciação tumoral, resultando em tumores cutâneos quimicamente induzidos bem diferenciados. Uma vez que foi demonstrado que os derivados dos falvonóides são capazes de afetar o padrão de diferenciação tumoral (ORSOLIC et al, 2005b), os dados obtidos nesta investigação poderiam estar indiretamente relacionados com o teor de flavonóides verificados no extrato. Suportando tal teoria, tem sido previamente relatado que flavonóides podem estimular a diferenciação terminal em linfócitos derivados de linhagem de células tumorais (CONSTANTINOU et al 1990). O mecanismo bioquímico e molecular adjacente aos efeitos biomodulatórios sobre a diferenciação de células tumorais não estão completamente esclarecidas, mas tem sido sugerida uma provável associação com a estimulação das vias de apoptose (LOWE et al, 2000). Adicionalmente, o extrato etanólico da própolis demonstrou aumentar significativamente o fator de necrose tumoral relacionado com ligante indutor de apoptose (TRAIL) na apoptose mediada por células cancerosas HeLa (células resistentes à apoptose TRAIL-induzidas) (SZLISZKA et al., 2009). No entanto, mais pesquisas são necessárias para

esclarecer a patogênese precisa de estímulos de diferenciação celular induzida pelo extrato de própolis.

Um achado histológico importante observado neste estudo foi a redução significativa na frequência da invasão muscular e de vasos linfáticos nos grupos tratados com o EHPV. Os mecanismos subjacentes a este efeito biológico ainda não estão bem esclarecidos. Tem sido demonstrado que os compostos químicos presentes no EHPV, tal como a artepelinina C e o CAPE, são capazes de bloquear seletivamente o gene PAK1 (MESSERLI et al, 2009; DEMESTRE et al, 2009). É bem estabelecido que a PAK1 é uma proteína-quinase intimamente relacionada com a angiogênese e a motilidade das células tumorais (KIOSSES et al, 2002). Portanto, o bloqueio da PAK1 pode reduzir a motilidade das células tumorais e consequentemente inibir a invasão em vasos linfáticos. Além disso, a inibição da angiogênese reduziria o componente vascular, minimizando o risco de formação de tumores em vias linfohematogênicas e metástases. Suportando esta teoria, Ahn et al (2007) demonstraram que a administração de artepelinina C derivado do EHPV promoveu um efeito antitumoral, como resultou no bloqueio da angiogênese. Além disso, já tem sido previamente relatado que os flavonóides são capazes de suprimir a produção de metaloproteinase, enzimas amplamente usadas pelas células tumorais na degradação da matriz extracelular (KANADASWAMI et al, 2005). Portanto, tais compostos químicos podem inibir a migração de células tumorais, o que poderia justificar a menor invasividade dos grupos tratados com o EHPV.

Tem sido demonstrado que os compostos polares encontrados na própolis, tal como os flavonóides, são capazes de modular a resposta inflamatória através da estimulação de macrófagos, aumentando a atividade fagocítica, bem como promover a liberação de citocinas, a exemplo o fator de necrose tumoral (TNF- α), e espécies reativas de oxigênio (FISCHER et al, 2008). Além disso, Fischer et al (2007) também demonstrou que o EHPV parece promover

o aumento da expressão de mRNA de interferon gama (IFN- γ), uma citocina intimamente relacionada com a regulação positiva da resposta imune mediada por células.

No entanto, não foram observadas diferenças na magnitude da resposta inflamatória entre os grupos, independentemente do tratamento com o EHPV. Estes achados sugerem que a natureza e a intensidade da resposta inflamatória contra os tumores epiteliais não foram influenciadas pelos componentes químicos presentes no extrato de própolis. Uma gama de diferentes fatores pode ter confluído para este resultado, como alternância na imunogenicidade das células tumorais, e variabilidade na concentração de diversos flavonóides e outros compostos fenólicos.

Em conclusão, foi possível demonstrar que a administração oral do EHPV exerceu um efeito quimiopreventivo sobre a carcinogênese dérmica quimicamente induzida, inibindo parcialmente o crescimento de tumores cutâneos, como também pareceu modular a diferenciação e potencial invasivo tumoral em modelo murino. Não obstante a estes achados, outros estudos ainda são necessários a fim de se desvendar os mecanismos que regem o papel quimiopreventivo exercido pela própolis verde brasileira.

Agradecimentos:

Agradecimentos à Fundação de Apoio a Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe, Brasil (FAPITEC/SE) pelo suporte financeiro.

Referências

1. AHN, M. R.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; AJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Suppression of tumor-induced

angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett.* 252(2):235-43; 2007.

2. ARAUJO, M. A. R.; LIBÉRIO, S. A.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Braz J Pharmacogn.* 22(1): 208-19; 2012.

3. ARAÚJO, M. J. A. M.; DUTRA, R. P.; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; LIBÉRIO, S. A. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff.* Postiça sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(4): 580-587, Ago./Set. 2010.

4. BONERANDI, J. J.; BEAUVILLAIN, C.; CAQUANT, L.; CHASSAGNE, V.; CHAUSSADE, J. F.; CLAVERE, P.; DESOUCHES, C.; GARNIER, F.; GROLLEAU, J. L.; GROSSIN, M.; JOURDAIN, A.; LEMONNIER, J. Y.; MAILLARD, H.; ORTONNE, N.; RIO, E.; SIMON, E.; SEI, J. F.; GROB-MARTIN, J. J. L. Guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous squamous cell carcinoma and precursor lesions: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol.25 (Suppl. 5), 1–51, 2011.

5. CAVALCANTE, D. R. R.; OLIVEIRA, P. S.; GÓIS, S. M.; SOARES, A. F.; CARDOSO, J. C.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE-JR, R. L. C. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Braz. j. otorhinolaryngol.* 77(3): 278-84, 2011.

6. CONSTANTINOU, A.; KIGUCHI, K.; HUBERMAN, E. Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K- 562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* 50: 2618-2624, 1990.

7. CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev.* 109(7):3012-43, 2009.

8. CUSTÓDIO, G.; LOCKS, L. H.; COAN, M. F.; GONÇALVES, C. O.; TREVISOL, D. J.; TREVISOL, F. S. Epidemiology of basal cell carcinomas in Tubarão, Santa Catarina (SC), Brazil between 1999 and 2008. *An Bras Dermatol.* 85(6):819-26, 2010
9. DAUGSCH A. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. (Tese de Doutorado), 2007.
10. DEMESTRE, M.; MESSERLI, S. M.; CELLI, N.; SHAHHOSSINI, M.; KLUWE, L.; MAUTNER, V.; MARUTA, H. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytother Res.* 23(2):226-30, 2009.
12. FERREIRA, P. M.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; CARVALHO, A. F. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. *An Acad Bras Cienc.* 83(3):1045-58, 2011
13. FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; DUMMER, L. A.; VARGAS, L. D.; HÜBNER, S. O.; DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, v. 25, p.1250- 1256, 2007.
14. FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun., 2008.
15. FRANCHI, G. C. JR.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:918956, 2012.
16. KANDASWAMI, C.; LEE, L. T.; LEE, P. P.; HWANG, J. J.; KE, F. C.; HUANG, Y. T.; LEE, M. T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo.* Sep-Oct;19(5):895-909, 2005

17. 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, 38(3):185-89, 2006.
18. KIM, R. H.; ARMSTRONG, A. W. Nonmelanoma skin cancer. Dermatol Clin. 30(1):125-39, 2012.
19. KIOSSES, W. B.; HOOD, J.; YANG, S. A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. Circ Res 90: 697– 702, 2002.
20. KORISH, A. A.; ARAFA, M. M. Propolis derivatives inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. Braz J Infect Dis. 15(4):332-8, 2011.
21. KUNIMASA, K.; AHN, M. R.; KOBAYASHI, T.; EGUCHI, R.; KUMAZAWA, S.; FUJIMORI, Y.; NAKANO, T.; NAKAYAMA, T.; KAJI, K.; OHTA, T. Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2. Evid Based Complement Alternat Med. 2009
22. LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis 21(3): 485-495, 2000.
23. MESSERLI, S. M.; AHN, M. R.; KUNIMASA, K.; YANAGIHARA, M.; TATEFUJI, T.; HASHIMOTO, K.; MAUTNER, V.; UTO, Y.; HORI, H.; KUMAZAWA, S.; KAJI, K.; OHTA, T.; MARUTA, H. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. Phytother Res. 23(3):423-7, 2009.
24. MOURA, S. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; LIMA, L. D.; DOURADO, L. P.; MENDES, J. B.; ANDRADE, S. P.; FERREIRA, M. A.; CARA, D. C. Aqueous Extract of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;

26. ORSOLIĆ, N.; SARANOVIĆ, A. B.; BASIĆ, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med.* 72(1):20-7, 2006.
27. 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.* 28(10):1928-33, 2005.
28. OZI, J. M.; SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M.; FRANA, S. A.; DIB, L. L. In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz Oral Res.* 25(6):519-25, 2011.
29. PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and markerenzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 143(3):349-54, 2006.
30. PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* 50(9): 2502-6, 2002.
31. SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R.; CAMPOS, L. C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C.; DE CASTRO, S. L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med*, 5(3):317-324, 2008.
32. SAWAYA, A. C.; BARBOSA DA SILVA CUNHA, I.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Cent J.* 5(1):27, 2011.
33. SAWAYA, A. C. H. F.; SOUZA, K. S.; MARCUCCI, M. C.; CUNHA, I. B. S.; SHIMIZU, M. T. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by

- chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 35(1-2): 104-9, 2004.
34. SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol.* 113(1):1-14, 2007.
35. SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; KOWALCZYK-ZIOMEK, G.; KROL, W. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol.* 38(4):941-53, 2011.
36. 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.
37. TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid Based Complement Alternat Med.* 7(3):307-315, 2010.
38. WATANABE, M. A.; AMARANTE, M. K.; CONTI, B. J.; SFORCIN, J. M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol.* 63(11):1378-86, 2011.
39. WU, J.; OMENE, C.; KARKOSZKA, J.; BOSLAND, M.; ECKARD, J.; KLEIN, C. B.; FRENKEL, K. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett.* 308(1):43-53, 2011.
40. YANOFSKY, V. R.; MERCER, S. E.; PHELPS, R. G. Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Journal of Skin Cancer*, Vol 2011, Article ID 210813, 13 p.

6. CONCLUSÕES GERAIS

6. CONCLUSÕES GERAIS

Como conclusão geral verificou-se que:

- A análise do ensaio biológico proposto demonstrou que a administração oral de extrato hidroalcoólico de própolis verde pareceu exercer efeitos quimiopreventivos na carcinogênese quimicamente induzida por DMBA na pele dos animais;
- A solução hidroalcoólica contendo extrato de própolis verde obtida e utilizada no tratamento dos carcinomas induzidos apresentou um teor de flavonóides aceitável, podendo ser este composto um dos principais responsáveis pela propriedade quimiopreventiva comprovada;
- A solução hidroalcoólica contendo extrato de própolis verde inibiu parcialmente o aumento de tumores cutâneos por DMBA-induzidos, bem como pareceu modular a diferenciação e potência infiltrativa dos tumores em modelo animal;
- O uso do extrato hidroalcoólico de própolis verde não pareceu agir de forma efetiva sobre a resposta inflamatória do hospedeiro em relação à invasidade tumoral;
- Não obstante, tais achados experimentais assistem de estudos mais aprofundados a fim de elucidar os mecanismos e o papel desempenhado pela própolis verde brasileira como quimiopreventivo

ANEXOS

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: TÍTULO: Atividade Quimiopreventiva da Própolis Sobre a Carcinogênese Dérmica Quimicamente Induzida.

Pesquisador Responsável Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Data da Versão 14/12/2009

Cadastro 231209

Data do Parecer 14/01/2010

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

Objetivos do Projeto

Geral

☐ Analisar o potencial quimiopreventivo do extrato hidroalcoólico de própolis em modelo experimental com roedores.

Específicos

☐ Induzir carcinogênese química em dorso de camundongos.

☐ Analisar histomorfologicamente a evolução das alterações displásicas do epitélio de revestimento da pele de camundongos tratados com carcinógeno químico (DMBA), em associação ou não com extrato hidroalcoólico de própolis.

Sumário do Projeto

O melanoma é a principal doença fatal originada na pele. Estima-se que o melanoma cutâneo represente cerca de 3% dos cânceres, segundo sua incidência, e um percentual que varia de 1% a 2% das mortes por câncer. Relatos de várias partes do mundo vêm demonstrando aumento em suas taxas de incidência e mortalidade. O aumento médio anual de incidência dessa neoplasia nos Estados Unidos da América é de aproximadamente 6%. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, as doenças tumorais neoplásicas vêm sendo indicadas como a terceira causa mortis mais frequente no Brasil. A cancerologia experimental é de grande valia para estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos, e tumores de camundongos apresentam alterações genéticas similares às detectadas em tumores humanos. Porém, a indução de tumores em roedores é dependente de um menor número de alterações genéticas que em humanos. A fim de aperfeiçoar a reabilitação de lesões tumorais, podem-se utilizar biomateriais, ou seja, materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro. Atualmente, estão em expansão linhas de pesquisas para novos compostos anti-neoplásicos e sua avaliação em vários sistemas tumorais e ou cultura de tecidos, objetivando selecionar compostos mais efetivos para o tratamento e controle das neoplasias. Um dos produtos utilizados para estudos antineoplásicos tem sido a própolis, por possuir compostos fenólicos incluindo os flavonóides conhecidos pela capacidade de eliminar radicais livres e pelas propriedades antioxidantes. A atividade antioxidante presente na própolis age como ativador na regeneração de tecidos e circulação sanguínea. A Própolis é uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa, fabricada por diversos gêneros de abelhas, sendo utilizada para esterelizar e impermeabilizar a colméia. Este fitoterápico tem amplo espectro de ações biológicas, como efeitos antimicrobiano, antimicótico, imunomodulador, cicatrizante e antioxidante, todos atribuídos à presença de flavonóides em sua composição. Diversas pesquisas farmacológicas têm sido realizadas com a própolis, os quais vêm demonstrando suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória. Para o desenvolvimento deste projeto, o mesmo será aplicado os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), sendo assim necessário a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UNIT/ Aracaju/SE. As coletas de própolis serão realizadas nos apiários do Município de Brejo Grande/SE, em caixas do tipo Langstroth previamente marcadas. A extração será realizada conforme a metodologia aplicada por PARK et al (1998). A concentração de flavonóides totais será determinada através do método descrito por Adelman (2005). Será utilizado um total de 90 camundongos *Mus musculus*, machos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximadamente 25±5g foram divididos em 6 grupos com 15 animais cada. A indução de carcinogênese cutânea será realizada

Página 1-3

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

através de aplicações de 100 µL de solução de 9,10 dimetil 1,2-benzantraceno (DMBA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), obtido na forma de pó e diluído em acetona a 0,5% (diluído em acetona P.A.), e a aplicação tópica será feita com a utilização de uma micropipeta, diretamente sobre a pele da região dorsal após tricotomia, três vezes por semana, durante um período de 16 semanas. Os animais dos grupos PR10, PR50, PR100 serão tratados com administração oral (gavagem) de extrato hidroalcoólico de própolis 10; 50 e 100 mg/Kg. Os grupos CTR1a e CTR1b recebem por gavagem as soluções de água destilada e Própolis respectivamente, e não recebem a carcinogênese induzida, funcionando como controle negativo. O controle positivo será o grupo CTR2 que receberá a aplicação do DMBA no dorso do camundongo e por gavagem água destilada. Decorridas as 16 semanas, os animais serão eutanasiados em três momentos: na 5ª, 9ª e 16ª semana, através da técnica de deslocamento cervical, para que a área do dorso do camundongo seja submetida à remoção post-mortem. Serão obtidas seções histológicas de 5µm de espessura, e estas submetidas à coloração de rotina pela Hematoxilina/Eosina. Para a análise morfológica das lesões serão utilizados cortes de 5µm corados por hematoxilina e eosina e examinados ao microscópio de luz (Microscópio Óptico Olympus CX31) por três observadores previamente calibrados. Os critérios analisados serão aqueles sugeridos pela Organização Mundial da Saúde e pela classificação de Banóczy, Sciba e em displasia de alto risco e baixo risco de acordo com o Sistema Binário de graduação de displasias epiteliais proposto por Kujan et al. A avaliação histomorfológica das seções histológicas e esfregaços citológicos será analisada descritivamente. Para comparação da média do perímetro celular e espessura epitelial, utilizará o teste F, para determinância de diferenças ou não na variância e, após, o teste T para determinação de diferenças entre as médias. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Este projeto tem como objetivo analisar o potencial quimiopreventivo do extrato hidroalcoólico de própolis em modelo experimental com roedores.

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	
Delimitação	Adequado
Tamanho de amostra	Total 90 Local 15
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
------------	----------

Página 2-3


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

Data de início prevista	mês 01
Data de término prevista	mês 12
Orçamento	Ausente
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

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

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O projeto está bem elaborado e documentado e irá gerar conhecimento relevante para a área. Recomenda-se aprovação.


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

Página 3-3

