

## Efeito da própolis verde sobre a carcinogênese dérmica experimental

Fellipe Santos Batista<sup>a</sup>, Kariny Souza Pinheiro<sup>b</sup>, Danielle Rodrigues Ribeiro Cavalcante<sup>c</sup>; Maria de Fátima Batista de Melo<sup>d</sup>, Juliana Cordeiro Cardoso<sup>e</sup>; Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior<sup>e</sup>

<sup>(a)</sup> Graduando em Odontologia – Universidade Tiradentes; <sup>(b)</sup> Mestranda em Saúde e Ambiente – Universidade Tiradentes; <sup>(c)</sup> Doutoranda em Biotecnologia – RENORBIO; <sup>(d)</sup> PhD. Professor Titular do Curso de Odontologia – Universidade Tiradentes/Universidade Federal de Sergipe; <sup>(e)</sup> PhD. Professor Titular do Curso de Mestrado em Saúde e Ambiente – Universidade Tiradentes.

---

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da administração oral do extrato hidroalcoólico de própolis 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 30 camundongos, divididos em 5 grupos (n=6): CTR (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 de carcinogênese foi realizada no dorso dos animais com aplicações tópica de DMBA. Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados, para que a área do dorso do camundongo fosse submetida a exame histológico *post-mortem*. O número médio de lesões induzidas em TUM (4,14±0,89) foi significativamente maior que em PV10 (2,05±1,02), PV50 (1,8±1,92) e PV100 (2,5±1,73) (p<0,05). Observou-se formação de tumores mais diferenciados nos grupos tratados com EHPV. Apenas em PV100, observou-se formação de neoplasias *in situ*. Evidenciou-se menor frequência de infiltração de estruturas nobres em tumores dos grupos tratados com EHPV (p<0,05). Os resultados sugerem que a administração oral de EHPV inibiu parcialmente a carcinogênese cutânea DMBA-induzida, bem como pareceu modular a diferenciação e capacidade infiltrativa tumoral em modelo murino.

**Palavras-chaves:** DMBA, própolis, câncer de pele.

---

### ABSTRACT

The aim of this study was to assess the effect of oral administration of hydroalcoholic extract of propolis on dermal carcinogenesis in rodent model. Therefore, we prepared the hydroalcoholic extract of green propolis (HEGP) and assess the flavonoids content. For the biological assay, we used 30 mice, assigned into 5 groups (n=6): CTR (treated with 100 mg/kg HEGP and no tumor induction), TUM (treated with water and tumor induction), PV10 (treated with 10 mg/kg HEGP and tumor induction), PV50 (treated with 50 mg/kg HEGP and tumor induction) and PV100 (treated with 100 mg/kg HEGP and tumor induction). Cancer induction was performed in the back of the mice by topical application of DMBA. After 16 weeks, mice were euthanized and their backs were submitted to *post-mortem* histological analysis. The mean number of lesions developed in TUM (4.14±0.89) was significantly higher than in PV10 (2.05±1.02), PV50 (1.8±1.92) and PV100 (2.5±1.73) (p<0.05). The tumors formed in HEGP-treated groups were histologically more differentiated, but only in PV100 *in situ* lesions were evidenced. Infiltration of anatomical noble structures was less frequent in HEGP-treated groups (p<0.05). Our data suggest that oral administration of HEGP provided partial inhibition of DMBA-induced dermal carcinogenesis, as well as appeared to modulate the differentiation and infiltrative potential of the carcinomas in rodent model.

**Key- Words:** DMBA, propolis, skin cancer.

---

### 1. Introdução

Câncer representa um grupo de mais de 100 doenças, e constitui, atualmente, um problema de saúde pública mundial, não somente por sua alta

prevalência, mas também por demandar consideráveis investimentos em ações e estratégias para seu controle, como na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência e tratamento dos pacientes e na vigilância epidemiológica (Cox, Sneyd, 2011).

O câncer de pele apresenta alta prevalência no mundo, 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). Além disso, estas neoplasias malignas também constituem os mais comuns tipos de câncer nos Estados Unidos (Kim, Armstrong, 2012). No Brasil, o câncer de pele também constitui a neoplasia maligna de maior incidência, sendo estimados cerca de 63 mil novos casos para o ano de 2012 (Ministério da Saúde, 2011).

O carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC) de pele é a segunda neoplasia maligna de pele mais comum no mundo, perdendo apenas para o carcinoma basocelular (Martins et al, 2007). Esta neoplasia se origina a partir da proliferação de células escamosas atípicas, tem caráter invasivo e pode produzir metástases. De maneira geral, os CECs acometem regiões expostas ao sol, e podem surgir, a partir de lesões não-invasivas, como: ceratoses actínicas (CA), queilites actínicas, leucoplasias orais e radiodermites crônicas (Kaur et al, 2010).

A carcinogênese 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 (Qi, Xu, 2006), e tumores de camundongos apresentam alterações genéticas similares às detectadas em tumores humanos (Yuspa, Glick, 2005; Fraga et al, 2004). Porém, a indução de tumores em roedores é dependente de um menor número de alterações genéticas que em humanos (Hahn, Weinberg, 2002). Já os camundongos podem desenvolver tumores malignos em um período relativamente curto (6-18 semanas), enquanto tumores malignos em humanos podem levar vários anos para atingirem um estágio equivalente (Balmain, Harris, 2000).

Alguns dos mais potentes carcinógenos iniciadores estão no grupo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Estes representam uma grande classe de compostos orgânicos presentes no ambiente, no cigarro, formados durante a produção e refinamento do petróleo, carvão e óleo mineral, entre outros. Eles requerem ativação metabólica e podem induzir tumores em uma grande variedade de tecidos e espécies (Kumar et al, 2005; Brasileiro Filho et al, 2006). Entre eles, encontra-se o DMBA, que é o hidrocarboneto aromático policíclico mais estudado,

sendo amplamente utilizado na carcinogênese experimental. Após exposição de roedores ao DMBA, uma variedade de tumores é induzida com elevada frequência. O DMBA é comumente utilizado na carcinogênese cutânea experimental em camundongos, pois a pele desses animais é muito responsiva aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Williams, Iatropoulos, 2001).

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 (Hussar, 2000; Aslani et al, 2000). Dentre as novas propostas terapêuticas, muitos pesquisadores 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 anti-neoplásico podendo ser utilizado como biomateriais de ação farmacológica eficiente (Senel, Mccluer, 2004).

Um dos produtos utilizados para estudos antineoplásicos tem sido a própolis, uma substância balsâmica de consistência viscosa, produzida a partir de resinas encontradas em exsudatos, brotos ou cascas das plantas, que são coletadas pelas abelhas do gênero *Apis mellifera* e modificadas por sua saliva (Maia-Araújo, 2009). No Brasil alguns tipos de própolis já foram caracterizados e classificados por região e estes pesquisadores revelaram que cada amostra de própolis, independente do local encontrado, possui um perfil químico diferenciado (Park et al, 2002).

Essa substância conquistou o *status* de apiterápico por demonstrar em pesquisas científicas um amplo espectro de ações biológicas, como efeitos antimicrobiano, antimicótico, imunomodulador, cicatrizante e antioxidante, todos atribuídos à presença de flavonóides (Daugusch et al, 2007) em sua composição. Além disso, Orsolich et al, (2004), demonstraram que compostos hidrossolúveis de própolis, como o ácido caféico, éster feniletílico do ácido caféico e a quercetina poderiam ter relação direta no controle do crescimento tumoral em modelos experimentais.

Recentemente, foi demonstrado que a administração oral de o extrato hidroalcoólico da própolis verde (EHPV) pode atuar nas etapas iniciais da carcinogênese experimental lingual, minimizando as alterações displásicas induzidas por DMBA (Cavalcante et al, 2011). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração oral do EHPV sobre a carcinogênese dérmica experimentalmente induzida.

## 2. Material e Métodos

**Aspectos éticos.** Para o desenvolvimento deste projeto, foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), sendo assim necessária a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UNIT/ Aracaju/SE. O estudo foi realizado no Biotério e no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), na Universidade Tiradentes (UNIT/SE).

**Coleta da própolis.** A própolis foi coletada em apiário na região Sudeste (Montes Claros, 16° 44' 06" S 43° 51' 43") devidamente armazenada, etiquetada e acondicionado em vasilhames estéreis, sob refrigeração e encaminhados ao Laboratório de Biomateriais no Instituto de Tecnologia e pesquisa-ITP, para posteriormente serem realizadas as extrações do produto natural.

**Obtenção do extrato de própolis.** Foi utilizada a metodologia de Maia-Araújo (2009) onde um grama de cada amostra de própolis foi colocado em tubo de ensaio estéril com 12,5 mL de etanol a 70% e em seguida levadas ao aparelho de ultra-som para extração durante 1 hora. Os extratos obtidos foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes deixados em capela de exaustão para completa evaporação do solvente e obtenção da massa. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido sob refrigeração. O rendimento da extração foi calculado em relação à massa inicial de própolis utilizada e expressa em porcentagem.

**Determinação de flavonóides totais.** A concentração de flavonóides totais foi determinada através do método descrito por Adelman (2005). Para determinar o teor de flavonóides totais nas amostras, foram adicionados volumes de 15 a 1000 µL dos extratos (concentrações de 5 a 100 mg/mL) a

uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio 10 % e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/litro. O volume final foi completado para 5 mL com etanol a 80%. As amostras foram homogeneizadas e após 40 minutos, em temperatura ambiente, a absorbância será determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda 415 nm. Para elaboração da curva de concentração padrão será utilizada a quercetina nas concentrações de 5 a 50 µg/mL dissolvida em etanol e os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes de quercetina (mg de quercetina em 100 mg de sólidos totais).

**Ensaio Biológico.** Um total de 30 camundongos *Mus musculus*, machos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximadamente 25±5g foram divididos em cinco grupos com seis animais cada:

**Quadro 1.** Distribuição dos grupos, de acordo com os produtos administrados por gavagem e aplicados no dorso dos animais.

Grupos	Produto aplicado na derme	Produto administrado por gavagem
CTR	Água destilada + 2 gotas de tween 80	EHPV 100 mg/Kg
TUM	DMBA a 0,5 %	Água Destilada 1 mL
PV10	DMBA a 0,5 %	EHPV a 10 mg/Kg
PV50	DMBA a 0,5 %	EHPV a 50 mg/Kg
PV100	DMBA a 0,5 %	EHPV a 100 mg/Kg

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

**Procedimento de indução de carcinogênese química.** A indução de carcinogênese cutânea foi realizada 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 foi feita com a utilização de uma micropipeta, diretamente sobre a pele da região dorsal após tricotomia, duas vezes por semana, durante um período de 16 semanas.

**Administração da Gavagem.** Para administração do extrato, o extrato seco foi ressuspendido em Tween 80 a 2% na concentração de 10 mg/mL. (A administração oral destas substâncias foi realizada utilizando cânulas estéreis de gavagem para camundongos (Insight, Ribeirão Preto, SP)), em dias alternados a aplicação do DMBA, ou seja, na segunda, quarta e sexta feira, por não interferir no procedimento de indução. Antes do início da indução, foi feita 1 semana de gavagem (chamada de gavagem de reforço) e estendendo-se por 16 semanas (KAVITHA E MANOHARAN, 2006).

**Análise macroscópica das lesões DMBA-induzidas.** Decorridas as 16 semanas, as lesões cutâneas produzidas em dorso de camundongos foram analisadas de acordo com o número de tumores observados em cada camundongo. Cada tumor também foi medido em seu maior diâmetro com auxílio de paquímetro digital (Startec®) e registradas em fichas previamente confeccionadas para esse propósito a fim de facilitar a análise ulterior.

**Procedimentos de processamento laboratorial e análise dos espécimes necropsiados.** Decorridas 16 semanas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> (fluxo contínuo de 100% de CO<sub>2</sub> por 50 min, Insight, Ribeirão Preto, SP) para que a área do dorso do camundongo fosse submetida à remoção *post-mortem*. Os espécimes teciduais foram fixados em formol tamponado (10%, pH 7,4) por 24 h, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico e diafanizados em xilol, para posterior inclusão em parafina. Foram obtidas secções histológicas de 5µm de espessura, e estas submetidas à coloração de rotina pela Hematoxilina/Eosina. Para a análise morfológica das lesões foram utilizados cortes de 5µm corados por hematoxilina e eosina e examinados ao microscópio de luz (Microscópio Óptico Olympus CX31). Os espécimes histológicos foram analisados quanto à presença ou ausência de tumor. Nos casos positivos, os tumores foram categorizados de acordo com sua classificação histológica em três tipos: Lesões intra-epiteliais não invasivas (carcinoma *in situ*), Carcinoma Verrucoso (não-invasivo ou micro-invasivo) e Carcinoma Epidermóide invasivo. Os tumores diagnosticados como Carcinoma

Epidermóide foram analisados histologicamente de acordo com os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Barnes et al, 2005) para gradação histológica de malignidade de carcinomas de pele, conforme descrito no quadro 2.

**Quadro 2.** Classificação dos tumores de pele (carcinomas) recomendado pela OMS (Barnes et al, 2005).

Gradação histológica – OMS	
Parâmetros	Características
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima queratinização
Moderadamente diferenciados	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca queratinização
Bem diferenciados	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso

O grau de invasão tumoral foi categorizado em três escores, de acordo com os seguintes critérios: *Grau 1* – tumores eminentemente exofíticos (papilíferos) e/ou com invasão limitada à derme papilar; *Grau 2* – tumores com invasão limitada à derme reticular, sem comprometimento dos tecidos hipodérmicos; *Grau 3* – tumores com invasão da hipoderme. Quando o parênquima tumoral atingia a hipoderme, foram avaliadas a presença ou ausência de *infiltração musculare* e *infiltração linfática (vascular)*.

**Procedimentos de Análise de Dados.** Os dados obtidos foram estruturados e tabulados sob a forma de frequência absoluta (n) e relativa (%), e comparados entre si por meio do teste estatístico não paramétrico Exato de Fischer. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de *p* foi menor ou igual a 0,05.

### 3. Resultados

Realizada a extração hidroalcoólica de amostra de própolis verde, verificou-se que o rendimento do extrato foi de 44,43%. O teor de flavonóides foi de 0,95 ± 0,44%.

Conforme observado na figura 1, a análise macroscópica revelou que o número médio de lesões induzidas no grupo TUM (4,14 ± 0,89) foi significativamente maior que em PV10 (2,05 ± 1,02), PV50 (1,80 ± 1,92) e PV100 (2,5 ± 1,73) (*p*<0,05), o

que sugere um provável efeito inibitório, ainda que parcial exercido pelo EHPV sobre a carcinogênese química induzida por DMBA. No entanto, mas não houve diferença entre os grupos tratados com EHPV ( $p>0,05$ ), sugerindo que tal efeito quimiopreventivo não estaria relacionado a uma atividade dose-dependente.

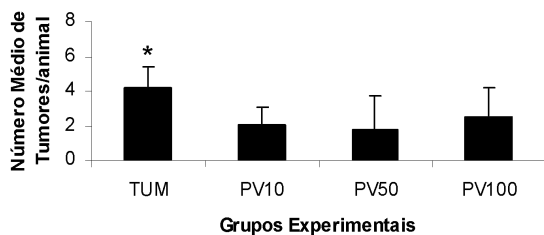


Figura 1. Determinação do número médio de tumores cutâneos induzidos quimicamente em dorso de camundongos tratados ou não com EHPV. (\*)  $p = 0,03$ .

Com relação à análise do diâmetro médio das lesões tumorais quimicamente induzidas, foi observado que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos estudados, independente do tratamento com EHPV ( $p>0,05$ ) (figura 2). Esses são sugestivos de que, apesar de apresentar um provável efeito inibitório na indução tumoral, a administração do EHPV não afeta a fração de crescimento dos tumores epiteliais uma vez que a promoção da carcinogênese tenha sido deflagrada.

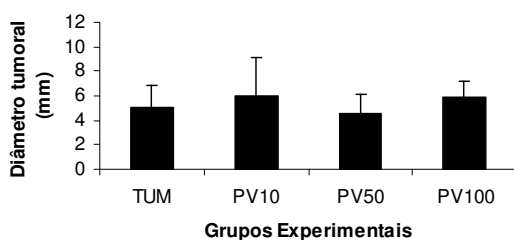


Figura 2. Determinação do diâmetro médio de tumores cutâneos induzidos quimicamente em dorso de camundongos tratados ou não com EHPV.

Com relação ao padrão morfológico dos tumores DMBA induzidos, foi evidenciada a formação de carcinoma *in situ*, carcinoma verrucoso e carcinoma epidermóide bem, moderadamente e pouco diferenciados (figura 3). Contudo, no grupo TUM, apenas 16,66% das neoplasias epiteliais estavam representadas por variantes não-invasivas do carcinoma epidermóide (carcinoma verrucoso e *in*

*situ*), enquanto que nos grupos tratados com EHPV essa frequência foi significativamente maior ( $p<0,05$ ), correspondendo a 50% em PV10, 40% em PV50 e 50% em PV100. Além disso, quando realizada a gradação histológica de malignidade dos tumores invasivos (carcinomas epidermóides), foi observado que, no grupo TUM, 40% das neoplasias foram classificadas como bem diferenciadas, 40% moderadamente diferenciadas e 20% pouco diferenciadas, enquanto que em todos os grupos tratados com EHPV apenas tumores bem diferenciados foram histologicamente observados. Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ), e sugere que a administração do extrato de própolis verde apresentou efeito modulatório sobre o padrão de diferenciação tumoral. Deve ser destacado que em um caso do grupo PV100 foi notada a indução de neoplasia epitelial *in situ*, no entanto, a relevância deste achado histológico deve ser encarada com parcimônia, posto que, do ponto de vista estatístico, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as diferentes doses do EHPV, sugerindo que o provável efeito quimiopreventivo deste extrato não seria dose-dependente (figura 4).

Com relação à avaliação histológica de infiltração tumoral em estruturas nobres, foi observado que, no grupo TUM, 83,33% dos casos apresentavam comprometimento muscular e 66,66% invasão de vasos linfáticos por células tumorais. Nos grupos tratados com EHPV, apenas um caso do grupo PV50 exibiu invasão muscular e linfática (20%) ( $p<0,05$ ), sugerindo que a administração do EHPV concorreu significativamente para a redução do potencial infiltrativa tumoral (figuras 5 e 6). Estes dados são de extrema relevância posto que a infiltração de estruturas dérmicas nobres representa um dos principais fatores determinantes de pobreza no prognóstico tumoral, em especial os vasos linfáticos, já que esta constitui a mais importante via de disseminação metastática de carcinomas epidermóides.

Conforme demonstrado na figura 7 e 8, todos os tumores quimicamente induzidos determinaram uma reação inflamatória do organismo de intensidade variada, mas não foi observada diferença significativa no padrão de intensidade da resposta inflamatória aos tumores quimicamente induzidos entre nenhum dos grupos estudados ( $p>0,05$ ), sugerindo que a administração oral do EHPV não interferiu na resposta imunológica do organismo frente a indução dos tumores epiteliais.

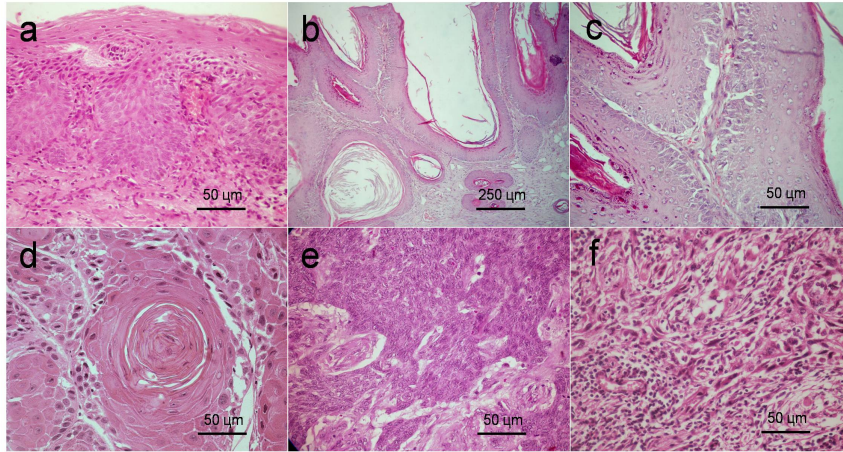


Figura 3. Secções histológicas coradas em HE demonstrando as diferentes formas de apresentação dos tumores dérmicos. (a) Carcinoma *in situ* caracterizado por atipia citológica em todas as camadas epiteliais, sem invasão dérmica; (b) Carcinoma Verrucoso mostrando projeções papilíferas altas e ocasionais tampões de queratina; (c) detalhe do tecido epitelial em Carcinoma Verrucoso demonstrando ausência de atipia; (d) Carcinoma Epidermóide Bem Diferenciado exibindo pouca atipia e queratinização evidente; (e) Carcinoma Epidermóide Moderadamente Diferenciado apresentando células de aspecto basalóide e ausência de queratinização; (f) Carcinoma Epidermóide Pouco Diferenciado caracterizado por proeminente atipia citológica e evidente dissociação celular.

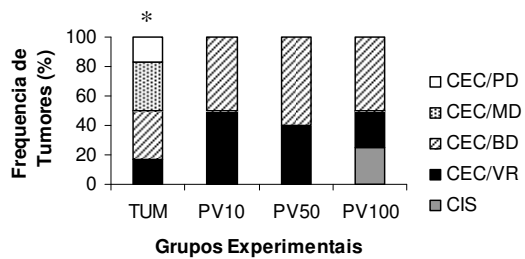


Figura 4. Distribuição da frequência relativa dos tumores epiteliais quimicamente induzidos nos diferentes grupos experimentais de acordo com o diagnóstico histopatológico e gradação histológica de malignidade. Legenda - **CEC/PD**: carcinoma epidermóide pouco diferenciado; **CEC/MD**: carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado; **CEC/BD**: carcinoma epidermóide bem diferenciado; **CEC/VR**: carcinoma verrucoso; **CIS**: carcinoma *in situ*.

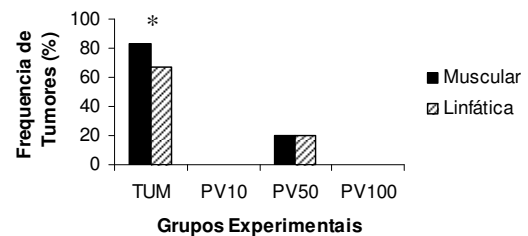


Figura 5. Distribuição da frequência relativa dos tumores epiteliais quimicamente induzidos nos diferentes grupos experimentais de acordo com a presença de infiltração tumoral muscular e/ou de vasos linfáticos hipodérmicos.

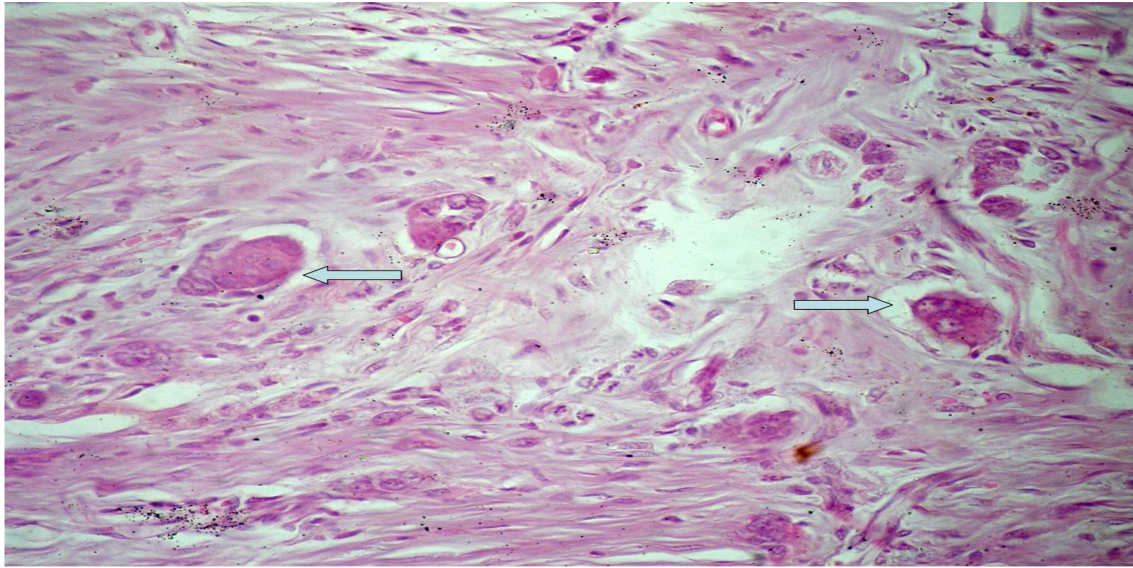


Figura 6. Presença de diminutas ilhotas epiteliais neoplásicas no interior de vasos linfáticos (setas) em carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado do grupo TUM (HE, 400x).

Conforme demonstrado na figura 7 e 8, todos os tumores quimicamente induzidos determinaram uma reação inflamatória do organismo de intensidade variada, mas não foi observada diferença significativa no padrão de intensidade da resposta inflamatória aos tumores quimicamente induzidos entre nenhum dos grupos estudados ( $p > 0,05$ ), sugerindo que a administração oral do EHPV não interferiu na resposta imunológica do organismo frente a indução dos tumores epiteliais.

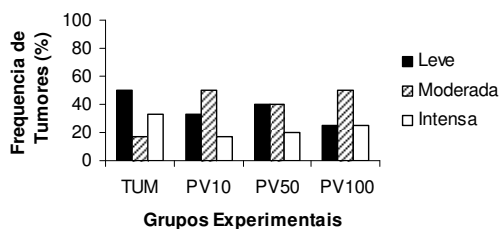


Figura 7. Frequência de tumores quimicamente induzidos de acordo com a intensidade da resposta inflamatória nos diferentes grupos experimentais

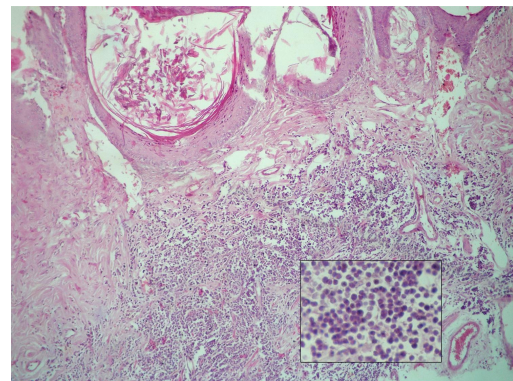


Figura 8. Presença de intensa resposta inflamatória em carcinoma verrucoso no grupo PV50 (HE, 100x). No detalhe, observa-se que a reação inflamatória é composta basicamente por linfócitos (HE, 400x).

#### 4. Discussão

O processo de carcinogênese apresenta vários estágios incluindo a iniciação, a promoção e a progressão do tumor (Almeida et al, 2005). Assim, o alvo de muitas pesquisas tem sido a descoberta de compostos naturais ou sintéticos que possam prevenir, retardar ou reverter o processo de

carcinogênese (Orsolich et al, 2005a;b). Nesse sentido, a própolis tem sido considerada como um dos mais promissores produtos utilizados na quimioprevenção e tratamento de várias doenças, em especial na carcinogênese (Kimoto et al, 1999; Orsolich et al, 2005<sup>a</sup>;b; Padmavathi et al, 2006).

No presente trabalho, a administração oral de EHPV promoveu inibição no crescimento médio de tumores epiteliais em modelo murino. A atividade antitumoral da própolis brasileira também tem sido comprovada em outros estudos (Araújo et al, 2010; Kunimasa et al, 2011).

Estudos efetuados por Demestre et al (2008) demonstraram que o CAPE, um composto químico encontrado em diversas amostras da própolis, promoveu inibição do crescimento de tumores de neurofibromatose humanos transfectados para camundongos.

Além disso, De maneira similar, Araújo et al (2010) observou que a administração oral de extrato hidroalcoólico de própolis verde promoveu significativa atividade antitumoral e correlacionou este efeito a uma provável inibição da síntese de óxido nítrico (NO). A produção de NO em tumores sólidos experimentais pode facilitar a permeabilidade vascular e o rápido crescimento do tumor, enquanto uma baixa produção deste metabólito pode causar um efeito oposto (Maeda, Akaike, 1998), justificando a atividade antitumoral deste produto natural.

Kunimasa et al (2011) também demonstrou a inibição da angiogênese por ação de extratos hidroalcoólicos de própolis verde brasileira, e correlacionou este efeito a inibição da sinalização anti-apoptótica promovida pela proteína ERK1/2. Tal teoria está embasada no fato de que durante a angiogênese tumoral, fatores estimuladores da proliferação endotelial, como o Fator de Crescimento Vásculo-Endotelial (VEGF) e Fator de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF) são liberados para promover a neovascularização dos tumores (Munoz-Chapuli et al, 2004). Tal atividade está intimamente associada à ativação de proteínas quinases (ERK1/2) responsáveis por bloquear a apoptose endotelial (Eguchi et al, 2007). Assim, a inibição da sinalização mediada pelo ERK1/2 levaria a apoptose endotelial e consequente bloqueio da angiogênese tumoral.

Outra possibilidade seria que a atividade antitumoral da própolis estivesse relacionada ao seu teor de flavonóides. Flavonóides são conhecidos por afetar a proliferação, diferenciação e apoptose de células cancerígenas (Kuo, 1996). O aumento dos índices de

apoptose tem sido associado à inibição do crescimento de células potencialmente oncogênicas (Campisi, 2005).

Além dos ésteres de ácido cafeico, artepilina C e flavonóides, outros constituintes químicos com atividade biológica importante vem sendo identificado na própolis. Chen et al (2004) observaram que a propilina C, um constituinte encontrado em extratos alcoólicos e hidroalcoólicos de própolis é capaz de induzir apoptose celular por provocar ativação de caspases e liberação citosólica do citocromo c mitocondrial em cultura de células de melanoma humano.

A administração do EHPV pareceu afetar o padrão de diferenciação tumoral, resultando em tumores epiteliais mais bem diferenciados. Posto que tem sido demonstrado que flavonóides derivados da dieta podem afetar o padrão de diferenciação celular tumoral (Orsolich et al, 2005b), os resultados observados neste estudo poderiam, indiretamente, estar associados ao teor de flavonóides obtidos no EHPV. Estímulo a maior diferenciação em células tumorais de linhagem linfocítica (HL-60 e k563) induzido por ação de flavonóides já havia sido observado em estudos prévios realizados por Constantinou et al (1990). Os mecanismos determinantes deste efeito modulatório sobre a diferenciação celular tumoral ainda são desconhecidos, mas tem sido sugerida uma provável relação entre este fenômeno fisiopatológico e a estimulação das vias reguladoras da apoptose (Lowe et al, 2000). No entanto, estudos posteriores são necessários a fim de esclarecer a patogênese da atividade estimulatória da diferenciação celular desempenhada pela administração oral de EHPV.

Um importante achado morfológico observado neste estudo foi a redução significativa na frequência de invasão muscular e linfática nos grupos tratados com EHPV. O mecanismo por trás deste efeito, contudo, ainda é obscuro. Foi recentemente demonstrado que a artepilina C e CAPE presente na própolis verde brasileira foram capazes de bloquear seletivamente o gene oncogênico PAK1 (Demestre et al, 2008). Está bem estabelecido na literatura que a proteína quinase PAK1 está intimamente relacionada com fenômenos de angiogênese e motilidade de células tumorais (Kiosses et al, 2002). Assim o bloqueio seletivo do gene PAK1 poderia determinar menor motilidade dos componentes celulares neoplásicos, reduzindo seu potencial invasivo, adicionalmente, a inibição na proliferação endotelial poderia levar a redução do componente vascular, minimizando o risco de



metástase linfo-hematogênica. Corroborando esta hipótese, Ahn et al (2007) observaram que a administração de extrato hidroalcoólico de própolis verde brasileira promoveu atividade antitumoral por promover bloqueio da angiogênese. Adicionalmente, também foi evidenciado que o principal componente responsável pela inibição da proliferação endotelial foi a artepilina C, um composto fenólico encontrado na própolis. Contudo, estudos posteriores são necessários a fim de esclarecer a natureza dos achados morfológicos observados neste estudo. Também tem sido postulado que flavonóides, compostos químicos encontrados na própolis, são capazes de suprimir a secreção de metaloproteinases, enzimas extensivamente necessárias à degradação da matriz extracelular por células tumorais (Kanadaswami et al, 2005). Portanto, tais constituintes químicos poderiam inibir a migração de células epiteliais neoplásicas, o que justificaria a menor invasividade dos tumores nos grupos tratados com EHPV.

Tem sido demonstrado que componentes polares encontrados na própolis, como flavonóides, são capazes de modular a resposta inflamatória por estimular macrófagos, aumentando sua atividade fagocitária, estimulação da secreção de citocinas, tais como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas do oxigênio e do componente C1q do complemento (Fischer et al, 2008). Além disso, Fischer et al (2007) demonstraram que o EHPV promove aumento da expressão de mRNA de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), uma citocina fortemente associada a resposta imune celular.

Contudo, não foi observada diferença na resposta inflamatória entre os grupos tratados ou não com EHPV. Tais achados sugerem que a magnitude da reação imune contra os tumores não foi influenciada pela administração oral do EHPV. Vários fatores poderiam ter determinado este achado, como variação na imunogenicidade das células tumorais, concentração dos diferentes tipos de flavonóides no extrato e tempo limitado para que a estimulação do sistema imunológico pudesse se expressar sob a forma de reação inflamatória. Assim, outros estudos são demandados para esclarecer a natureza destes achados.

## 5. Conclusões

Os resultados sugerem que a administração oral de EHPV inibiu parcialmente a carcinogênese cutânea

DMBA-induzida, bem como pareceu modular a diferenciação e capacidade infiltrativa tumoral em modelo murino.

## 5. Referências

- ADELMAN J. Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2005.
- ALMEIDA V L, LEITÃO A, REINA LCB, MONTANARI CA, DONNICI CL, LOPES MTP 2005. Câncer e agentes antineoplásicos, ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova* 28: 118-129.
- ARAÚJO M J A M., DUTRA R P., COSTA G C., REIS A S., ASSUNÇÃO A K M., LIBÉRIO S A. ET AL. 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.
- ASLANI, A.; et al. The predictive value of body protein for chemotherapy-induced toxicity. *Cancer*. v. 88, p. 796-803, 2000.
- BALMAIN, A. et al. Molecular analysis of carcinogenesis in the skin. *Br. J. Cancer*, 58(Suppl IX): 72-75, 1988.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, 21(3): 371-377, 2000.
- BARNES L, EVENSON JW, REICHAERT P, SINDRANSKY D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press: Lyon; 2005.
- BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo – Patologia. 7a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2006, 1488p.
- 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. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 77 (3) May/June 2011 <http://www.bjorl.org> / e-mail: revista@aborlccf.org.br
- CAMPISI J 2005. Aging, tumor suppression and cancer: high wireact! *Mech Agein Dev* 126: 51-58.
- CHEN, C. N., WU, C. L. E LIN, J. K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human

- melanoma cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 67, p. 53-66, 2004.
- CONSTANTINO A, KIGUCHI K AND 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.
- COX B, SNEYD MJ. A regional non-melanoma skin cancer (NMSC) collection as part of the National Cancer Registry. *N Z Med J*. 2011 Nov 25;124(1346):101-2.
- CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents (dagger). *Chem Rev*. 2009 May 7. [Epub ahead of print]
- DAUSCH, A. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP/SP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.
- DEMESTRE M. ; MESSERLI S. M. ; CELLI N. ; CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)-based Propolis Extract (Bio 30) Suppresses the Growth of Human Neurofibromatosis (NF) Tumor Xenografts in Mice. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, p.5, 2008.
- EGUCHI R, SUZUKI A, MIYAKAZE S, KAJI K, AND OHTA T, "Hypoxia induces apoptosis of HUVECs in an in vitro capillary model by activating proapoptotic signal p38 through female F344 rats. *Cancer Lett* 147: 221-227, 2007.
- FRAGA, M. F. et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res*, 64 (16): 5527-5534, 2004.
- FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, L.D.; HÜBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, v. 25, p.1250-1256, 2007.
- FISCHER, G.; HÜBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun., 2008.
- HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 331-341, 2002.
- HERSIG, M.; CHRISTOFORI, G. Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1602: 97-113, 2002.
- HUSSAR, D. A. New drugs 2000. Part I. *Nursing*. v. 30, p. 55-62, 2000.
- KANDASWAMI C, LEE LT, LEE PP, HWANG JJ, KE FC, HUANG YT, LEE MT. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*. 2005 Sep-Oct;19(5):895-909.
- KAUR J, SHARMA M, P.D. SHARMA AND M.P. BANSAL. Antitumor Activity of Lantadenes in DMBA/TPA Induced Skin Tumors in Mice: Expression of Transcription Factors. *Am. J. Biomed. Sci*. 2010, 2(1), 79-90; doi: 10.5099/aj100100079.
- KAVITHA, K.; MANOHARAN, S. Anticarcinogenic and antilipidperoxidative effects of tephrosia purpurea (linn.) Pers. In 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (dmdba) induced hamsters buccal pouch carcinoma. *Indian J Pharmacol*, v.38, n.3, p.185-89, 2006.
- KAZUHIRO KUNIMASA; MOK-RYEON A.; KOBAYASHI T.; Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. V. , p. 1-8, 2011.
- KIM RH, ARMSTRONG AW. Nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Clin*. 2012 Jan;30(1):125-39. Epub 20.
- KIMOTO N, HIROSE M, KAWABE M, SATOH T, MIYATAKA H, SHIRAI T 1999. Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in
- KIOSSES WB, HOOD J, YANG S et al. 2002. A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. *Circ Res* 90: 697-702.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005, 1525p.
- KUO SM 1996. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 110: 41-48.
- LOWE SW AND LIN AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3): 485-495, 2000.
- MAEDA H, AKAIKE T 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochem* 63: 854-865.
- MAIA-ARAÚJO, Y. L. F. Estudo Da Atividade Antimicrobiana De Variedades De Própolis da Região da Foz do Rio São Francisco – Brasil. (Dissertação de Mestrado) 2009.
- MARTINS IL, ALVES CS, COSTA PMC, MENDONÇA VLM. Perfil do câncer de pele em pacientes do instituto do câncer do Ceará no período de 2000 a 2003. *Revista Brasileira em promoção de saúde*, ano/vol.20, número 001. Universidade de Fortaleza. Fortaleza, Brasil, 2007.

- 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.
- MOK-RYEON AHN.; KAZUHIRO K.; TOSHIRO O. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters* 252: 235–243, 2007.
- MUNOZ-CHAPULI R, QUESADA AR, AND ANGEL MEDINA M, “Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61, pp. 2224–2243, 2004.
- ORSOLIC N, KNEZEVIC AH, SVER L, TERZIC S, BASIC I 2004. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 94: 307-315.
- ORSOLIC N, KOSALEC I, Basic I 2005a. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. *Biol Pharm Bull* 28: 694-700.
- ORSOLIC N, KOSALEC I, Basic I 2005b. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull* 28: 1928-1933.
- PADMAVATHI R, SENTHILNATHAN P, SAKTHISEKARAN, D 2006. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbez(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. *Comp Biochem Physiol* 143: 349-354.
- PARK, Y.K, ALENCAR S.M, AGUIAR, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.2502-2506. 2002.
- QI, L.& XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic Med. Chem. Letters*. v. 16, n. 16, p.4243-4245, 2006.
- SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Delivery Rev.* v.56, p. 1467-1480, 2004.
- STAPLES MP, ELWOOD M, BURTON RC, WILLIAMS JL, MARKS R, GILES GG. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust.* 2006;184:6-10
- 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. 2001. Chapter 20, 959-1000, 1887p.
- YUSPA, S.H.; GLICK, A. B: Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin. Cancer Biol.*,15: 75-83, 2005.