

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PARA RECURSOS AMAZÔNICOS - PPGCTRA

Avaliação do efeito do extrato aquoso de própolis sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 irradiadas com Cobalto-60

NAIRA DE SOUZA GOMES NOGUEIRA

ITACOATIARA
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PARA RECURSOS AMAZÔNICOS- PPGCTRA

NAIRA DE SOUZA GOMES NOGUEIRA

Avaliação do efeito do extrato aquoso de própolis sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 irradiadas com cobalto-60

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. **Patrícia Lima Falcão**

ITACOATIARA
2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N778a Nogueira, Naira de Souza Gomes
Avaliação do efeito do extrato aquoso de própolis sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 irradiadas com Cobalto-60 / Naira de Souza Gomes Nogueira. 2017
101 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Patrícia Lima Falcão
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Própolis. 2. Viabilidade. 3. Câncer. 4. Mama. 5. Radiação. I. Falcão, Patrícia Lima II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

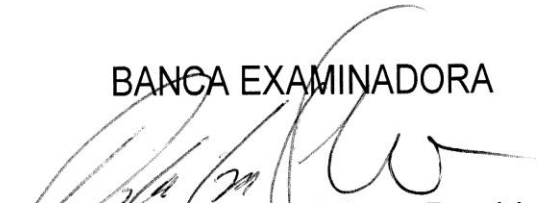
NAIRA DE SOUZA GOMES NOGUEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS
SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) E DE ADENOCARCINOMA DE
MAMA MDA-MB-231 IRRADIADAS COM COBALTO-60.

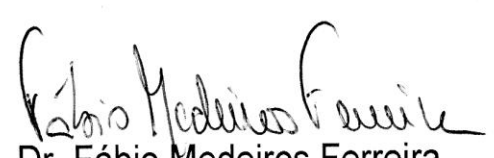
Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia para Recursos Amazônicos
da Universidade Federal do Amazonas,
como parte do requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia para Recursos Amazônicos,
área de concentração Desenvolvimento
Científico e Tecnológico em Recursos
Amazônicos.

Aprovada em 08 de agosto de 2017.

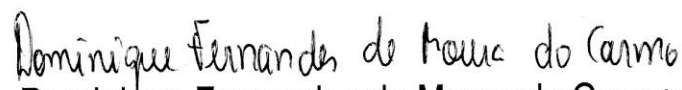
BANCA EXAMINADORA



Dra. Patrícia Lima Falcão, Presidente
Universidade Federal de Minas Gerais



Dr. Fábio Medeiros Ferreira
Universidade Federal do Amazonas



Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai José Lázaro e minha mãe Maria Madalena, por acreditarem em mim, sempre se orgulhando a cada passo percorrido.

Ao meu marido Wagner, parceiro, cúmplice, amigo, amante, meu ouvinte atento e sábio nas horas mais difíceis. Apesar das minhas dificuldades, dos estresses, soube ser compreensivo e incentivar-me a prosseguir.

Aos meus filhos, Diogo Emanuel e Pablo Emanuel, as heranças que recebi do Senhor, seus sorrisos e abraços me deram muita força nesta caminhada.

À minha irmã Nádia que me ajudou muito nesse caminho, sempre com um ombro amigo oferecendo cuidado, quando as necessidades de ajuda eram grandes e parecia não ter solução.

AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS, fonte de vida, inspiração, dono de toda ciência, sabedoria e poder, sem o qual nada sou que me concedeu esta oportunidade e me capacitou para a caminhada. A Ele toda a Honra e toda a Glória

À minha querida ORIENTADORA Prof^a Dr^a Patrícia Lima Falcão, pela sua disponibilidade em prestar toda orientação, esclarecimentos e pelo acompanhamento durante a execução de todo o trabalho;

Ao Prof. Dr. Tarcísio Passos Ribeiro de Campos, pelo apoio, pela confiança e a oportunidade de desenvolver este estudo no Núcleo de Radiações Ionizantes – NRI/UFMG;

Aos docentes do Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos- PPGCTRA, obrigada pelo apoio. Vocês realmente são educadores e ministram sobre nós;

Aos meus queridos Professores Dr. Fábio Medeiros Ferreira e Dr. Geone Maia Correa pela grande contribuição nesse trabalho;

À professora Dr^a Renata Takeara que disponibilizou o laboratório 109 para que eu pudesse desenvolver os testes de prospecção química.

Ao meu colega Emerson Dantas, técnico de laboratório em Biologia, pela disponibilidade em cobrir meu horário no laboratório.

Ao senhor Fernando, proprietário da fazenda Poranga, que disponibilizou as amostras de própolis.

Às alunas Clícia e Kelly que me ajudaram nas análises de prospecção química do extrato.

A todos que contribuíram direta e indiretamente na elaboração desse trabalho.

OBRIGADA.

Os entendidos, pois resplandecerão como o resplendor do firmamento; e os que a muitos ensinam a justiça refulgirão como as estrelas sempre e eternamente.

Daniel 12:3

RESUMO

O câncer de mama é uma doença agressiva cuja incidência e mortalidade tem aumentado nos últimos anos. Por esse motivo tem despertado preocupação por parte das políticas de saúde pública, sendo alvo de pesquisas internacionais e nacionais. Dentre os tratamentos para o câncer de mama tem-se a radioterapia, que se emprega radiação ionizante, no entanto com limitações devido a seus efeitos tóxicos nos tecidos normais. O desenvolvimento de drogas de origem vegetal associado ao tratamento de radioterapia é promissor, uma vez que estas substâncias modificam os efeitos da radiação minimizando seus danos ao paciente. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do extrato aquoso da própolis (EAP) sobre a viabilidade celular de células da linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 e sobre a viabilidade celular de células mononucleadas do sangue periférico humano (PBMC). As células foram irradiadas com radiação de baixa LET (Linear Energy Transfer) de acordo com a cinética de doses pré-determinadas (2 e 5 Gy) e suplementadas com EAP nas concentrações de 0,5% e 1%, 5% e 10%. As coletas pós-irradiação foram realizadas nos tempos pré-estabelecidos de 24, 48 e 72 horas. O presente estudo mostrou que as radiações ionizantes produzem efeito de diminuição significativa nos parâmetros de viabilidade celular em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Enquanto que no grupo de células suplementadas com EAP em adição de radiação, os danos causados foram minimizados. No que diz respeito às células de adenocarcinoma de mama MDA-231, verificou-se que houve uma redução no nível de sobrevivência dessas células quando submetidas à radiação, ao passo que esse efeito foi potencializado no momento em que a cultura de células foi suplementada com extrato aquoso de própolis. A suplementação com extrato de própolis no tratamento de radioterapia ofereceu uma proteção bastante mensurável contra danos às células PBMCs. Além disso, o extrato de própolis potencializa a apoptose celular de células de adenocarcinoma de mama radio resistente. Os resultados através desta investigação podem servir como subsídio para a utilização do extrato de própolis potencializando os efeitos do tratamento radioterápico em pacientes com câncer de mama.

Palavras chaves: câncer, mama, radiação e própolis

ABSTRACTS

Breast cancer is an aggressive disease whose incidence and mortality have increased in recent years. For this reason it has raised concern about public health policies, being the target of research worldwide. Among the treatments for breast cancer is the radiation therapy, which applies ionizing radiation, however, with limitations due to its toxic effects on normal tissues. The development of drugs of vegetal origin associated to the treatment of radiotherapy, has become very promising, since these substances modify the effects of the radiation minimizing its damages to the individual. The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* effect of the propolis extract on the cell viability of MDA-MB-231 line adenocarcinoma cells and on the cell viability of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The cells were irradiated with Low LET radiation (Linear Energy Transfer) according to the kinetics of predetermined doses (2 and 5 Gy) and supplemented with propolis extract at the concentrations of 0.5% and 1%, 5% and 10%. Post-irradiation collections were performed at the pre-established times of 24, 48 and 72 hours. The present study showed that ionizing radiation is accompanied by a significant decrease in cell viability parameters in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). While in the group of cells supplemented with propolis extract plus radiation, there was a decrease in the damage caused by these radiations. With regard to MDA-231 breast adenocarcinoma cells, there was a significant reduction in the survival level of these cells when subjected to radiation, whereas that effect was potentiated at the time the cell culture was supplemented with propolis extract. Supplementation with propolis extract in the treatment of radiotherapy offers a very measurable protection against cell damage to PBMCs. On the other hand, the propolis extract potentiates the cellular apoptosis of adenocarcinoma cells of resistant breast radio. The data obtained through this investigation can serve as a subsidy for the use of the propolis extract, potentializing the effects of radiotherapy treatment in patients with breast cancer.

Key words: cancer, breast, radiation and propolis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1** – Microscopia óptica células de MDA-MB-23123
- Figura 2** - (A) Própolis depositada no interior da colméia; (B) deposição de própolis na tampa da colméia da abelha Borá (*Tetragona clavipes*)28
- Figura 3** Estrutura química do CAPE29
- Figura 4** - Estrutura química da artemilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico).....29

CAPITULO I

- Figura 1** - Campos ópticos arbitrários em microscopia inversa (800 X) de PMBC em cultura, em cinética de tempo para o teste de MTT.....45
- Figura 2** - Campos ópticos arbitrários em microscopia inversa (800 X) da PMBC em cultura, em concentrações distintas de própolis (PP), dose de irradiação e cinética de tempo.50

CAPITULO II

- Figura 1** - Campos ópticos arbitrários em microscopia inversa (800 X) das células de adenocarcinoma de mama MDA MB-231 em cultura, em cinética de tempo para o teste de MTT.....64

CAPITULO III

- Figura 1**- Resultado para o teste de fenóis e taninos – presença de taninos condensados com a verificação de intensidade de cor.80
- Figura 2**- Resultado para determinação de antocianidinas, antocianinas e flavonoides81
- Figura 3**- Resultado para o teste de determinação leucoantocianidinas, catequinas e flavonas82
- Figura 4**- Resultado para determinação de esteróides e triterpenoides (Lieberman – Burchard)– presença decoloração avermelhada indicando triterpenoides pentacíclicos83
- Figura 5**- Resultado para o teste de determinação de saponinas – Formação de espuma, após aquecimento formação de precipitado.84

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Perfis de viabilidade celular em densidade óptica - DO na cinética nos tempos de 24, 48 e 72 h, determinados pelo teste de MTT em cultura in vitro de PBMCs antes e após a exposição às concentrações de 0,5%; 1%; 5% e 10% de extrato aquoso de própolis (EAP). Médias seguidas pelas mesmas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si. *DMS – Diferença mínima significativa. # células que não receberam tratamento com EAP.47

Tabela 2 - Perfis de viabilidade celular em densidade óptica - DO na cinética de tempo de 24, 48 e 72 hs, determinada pelo teste de MTT de cultura in vitro de PBMCs, antes e após a exposição à radiação na dose de 2Gy e submetidas as concentrações de 1% 10% de extrato aquoso de própolis (EAP). Médias seguidas pelas mesmas letras pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL ao diferem estatisticamente entre si *DMS – Diferença mínima significativa. # células que não receberam tratamento com EAP.48

Tabela 3 - Perfis de viabilidade celular em densidade óptica – DO na cinética de tempo de 24, 48 e 72 h, determinados pelo teste de MTT em cultura in vitro de PBMCs, antes e após a exposição à radiação nas doses de 5Gy, e submetidas as concentrações de 1% e 10% de extrato aquoso de própolis. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.* DMS-Diferença mínima significativa. # Células que não foram tratadas com EAP e foram irradiadas com doses de 5 Gy de radiação.49

CAPITULO II

Tabela 1- Perfis de viabilidade em densidade óptica na cinética de tempos de 24, 48 e 72 horas, determinados pelo teste de MTT em cultura in vitro de MDA-MB-231 antes (controle) e após a exposição às concentrações de 1% e 10% de própolis. Letras maiúsculas iguais nas linhas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tempos dentro de cada tratamento (controle e os extrato de própolis). Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tratamentos dentro de cada tempo (24,48 e 72 horas). DMS – Diferença mínima significativa.63

Tabela 2 - Perfis de sobrevivência em cinética nos tempos de 24, 48 e 72 horas, determinados pelo teste de MTT em cultura in vitro de MDA-MB-231 antes (controle) e após a exposição às concentrações de 1% e 10% de extrato aquoso de própolis e irradiação na dose de 2Gy. Letras maiúsculas iguais nas linhas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tempos dentro de cada tratamento (controle e os extrato de própolis). Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey)na comparação dos tratamentos dentro de cada tempo (24,48 e 72 horas).65

Tabela 3 - Perfis de viabilidade em densidade óptica na cinética nos tempos de 24, 48 e 72 horas, determinados pelo teste de MTT em cultura in vitro de MDA-MB-231 antes (controle) e após a exposição às concentrações de 1% e 10% de extrato aquoso de própolis e irradiação na dose de 5Gy. Letras maiúsculas iguais nas linhas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tempos dentro de cada tratamento (controle e os extrato de própolis). Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tratamentos dentro de cada tempo (24,48 e 72 horas) *DMS - Diferença Mínima significativa.66

LISTA DE ABREVIATURAS

AEM -Auto Exame de Mamas

AET – Brometo de 2-aminoetilisotiuréia

CAPE – éster fenetílico ácido cafeíco

CO₂– Dióxido de carbono

ECM - Exame Clínico de Mamas

ELISA – (Enzyme-linkedImmunosorbentAssay) – Ensaio Imunoenzimático

EAP- Extrato Aquoso de Própolis

Gy – Gray

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LET - Linear Energy Transfer

MTT – Sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

MDA- 231 Célula de adenocarcinoma mamário humano

NK - Natural Killer

PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells – Célulasmononucleares do sangueperiférico

ROS - Speciesoxigenreactives

RPMI-1640 – Meio desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial, utilizado para cultura de leucócitos

RT - Radioterapia

SBF – Soro fetal bovino

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFAM- Universiade Federal do Amazonas

UNSCEAR – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation

UV-ultravioleta

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	16
2 - REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 - Câncer de mama	19
2.2 - Radioterapia	20
2.3 - Células de linhagem tumoral – adenocarcinoma de mama MDA-MB-231	21
2.4 – PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMCS)	23
2.5 – Radioprotetores	25
2.6- Abelha <i>Tetragona Clavipes</i> (Borá)	26
2.7 - Flavonoides e própolis.....	27
2.7- Interferências da natureza na qualidade e na produção da própolis	30
3 –OBJETIVOS	33
3.1- OBJETIVO GERAL	33
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
CAPITULO I	34
RADIOPROTEÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO ATRAVÉS DE EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS DE <i>TETRAGONA CLAVIPES</i>	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1 - INTRODUÇÃO	37
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1- PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS (EAP)	40
2.2- LINHAGENS PRÉ-ESTABELECIDAS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	40
2.3- SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS PBMC	40
2.4- CONTROLE.....	41
2.5- TRATAMENTO DAS CULTURAS COM PRÓPOLIS	41
2.6- RADIAÇÃO E CINÉTICA DE DOSE.....	42
2.7- CINÉTICA NO TEMPO.....	42

2.8- AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE	42
2.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3 - RESULTADOS	45
4 - DISCUSSÃO	51
5 - CONCLUSÃO	53
CAPITULO II	54
EFEITO DO EXTRATO DA PRÓPOLIS DE <i>TETRAGONA CLAVIPES</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MDA-MB-231 IRRADIADAS COM COBALTO-60.....	54
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56
1 – INTRODUÇÃO	57
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1 - PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS	59
2.2 - LINHAGEM PRÉ-ESTABELECIDAS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	59
2.3- CONTROLE.....	60
2.4 - TRATAMENTO DAS CULTURAS COM PRÓPOLIS.....	60
2.5- RADIAÇÃO E CINÉTICA DE DOSE	60
2.6 - CINÉTICA NO TEMPO	60
2.7- AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE	61
2.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
3 – RESULTADOS.....	63
4- DISCUSSÃO	67
5 - CONCLUSÃO	70
CAPITULO III.....	71
PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS DE <i>TETRAGONA CLAVIPES</i>	71
RESUMO.....	72

ABSTRAT	73
1 - INTRODUÇÃO	74
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	76
2.1- Coleta das amostras de própolis	76
2.2 - Preparação e abordagem química do extrato aquoso de própolis (EAP)	76
2.3 - Preparação da solução-estoque e prospecções química	76
2.4 - Teste para determinação de fenóis e taninos	77
2.5 - Teste para determinação de antocianidinas, antocianinas e outros flavonoides	77
2.7- Teste para determinação de esteroides e triterpenoides (LIEBERMAN – BURCHARD)	78
2.8 - Teste para determinação de saponinas	78
2.9 - Teste confirmatório para saponinas	79
3 – RESULTADOS	80
3.1- Teste para determinação de fenóis e taninos	80
3.2- Teste para determinação de antocianidinas, antocianinas e flavonoides	80
3.4 - Teste para determinação de esteroides e triterpenoides (LIEBERMAN – BURCHARD)	82
3.5 - Teste para determinação de saponinas	83
4 - DISCUSSÃO	85
5 - CONCLUSÃO	88
4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
5 - REFERENCIAS.....	90

1 - INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (INCA, 2015).

No Brasil foram estimados para 2016/2017 aproximadamente 57.960 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Os fatores de risco que contribuem para o aumento do desenvolvimento do câncer de mama são: envelhecimento, vida reprodutiva da mulher, histórico familiar de câncer de mama, alta densidade do tecido mamário, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo e exposição à radiação ionizante (INCA, 2015).

Neste contexto, as terapias utilizadas no tratamento do câncer são: cirurgias conservadoras e/ou radicais, radioterapia complementar, quimioterapia e/ou hormonioterapia, fundamentada de acordo com a análise da técnica da Imuno-histoquímica (IHQ) (GODINHO & KOCH, 2004).

Neste sentido, a radioterapia apresenta grande eficiência sendo um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. No entanto, estas radiações, podem interagir com os tecidos, dando origem a elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. As interações causadas por estas radiações podem resultar em morte celular através de vários

mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução (INCA, 2015).

Dentre as linhagens tumorais submetidas à radioterapia consideradas potencialmente mais agressivas, podendo produzir recidivas, vale menciona-se a linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 que é considerada radioresistente, sendo necessárias altas doses de radiação para a obtenção da diminuição de sua viabilidade celular (FALCÃO *et al.*, 2015).

Neste contexto, concomitantemente ao tratamento de radioterapia o paciente pode ser induzido a um estado de imunossupressão, devido à morte das células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs), sendo neste caso consideradas radiosensíveis. Estas células desempenham papel importante na defesa do organismo durante o tratamento radioterápico, fornecendo aporte fisiológico ao paciente para resistir ao tratamento, reduzindo a própria imunossupressão e, conseqüentemente, potencializando a resposta imunológica do paciente durante e após o tratamento (FALCÃO *et al.*, 2015).

As investigações sobre terapias adjuvantes ao tratamento de radioterapia tem se ampliado. A fim de reduzir as complicações causadas por esse método, tem sido usado de radioprotetores eficazes e não tóxicos (KIM & YOUN, 2006). Todavia muitos compostos sintéticos testados tem apresentado um sucesso limitado, levando a efeitos prejudiciais (WEISS & LANDAUER, 2009).

Na expectativa de reduzir tais efeitos, muitas substâncias que ocorrem naturalmente têm sido consideradas como candidatas para a radio proteção, nesse grupo destacam-se os antioxidantes que são substâncias encontradas em muitos produtos naturais e possuem potencial para neutralizar os efeitos causados pela radiação (BENKOVIC *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação dos antioxidantes, consiste em que o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres $R\cdot$ e $RO\cdot$ com maior facilidade do que os

hidrogênios alílicos da moléculas insaturadas. Assim formam-se espécies inativas para reação em cadeia e um radical inerte (A') procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância não tem a capacidade de iniciar ou propagar reações oxidativas (FOOD, 2009).

Desse modo, os antioxidantes presentes na própolis, bem como substâncias flavonóides como o éster feniletíl do ácido cafeico (CAPE), no qual podem fazer com a própolis apresente propriedades antiviral (BURDOCK, 1998; FISCHER *et al.*, 2005), antiinflamatória (ANSORGE *et al.*, 2003), antioxidante (SCHELLER *et al.*, 1989) e antiparasitária (DECASTRO; HIGASHI, 1995; DANTAS *et al.*, 2006; BANKOVA *et al.*, 2000).

Dessa forma, considerando a relevância do tema e a abordagem da utilização de produtos naturais da região Amazônica nos tratamentos de doenças graves na atualidade, como é caso do câncer, os resultados qualitativos do referido estudo quando finalizados incluem uma melhor compreensão do efeito do extrato aquoso de própolis sobre a viabilidade das células PBMC's e de linhagens de adenocarcinoma de mama. Nesta perspectiva, pretende-se com esse estudo demonstrar o efeito estimulante do nível de sobrevivência das células mononucleares do sangue periférico e citotóxico sobre as células de câncer de mama.

A investigação do papel de produtos naturais, como a própolis, em estudos *in vitro* e *in vivo*, quando finalizados, deverão fornecer suporte para os tratamentos radioterápicos atuais, provavelmente diminuir o tempo de tratamento, elevando a sua eficiência, uma vez que o efeito radioprotetor da própolis contribui para a eficiência do sistema imunológico em resposta ao fracionamento de doses de radiação prescritas nos planejamentos radioterápicos em diversos tipos de tumores (EBEID *et al.*, 2016).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Câncer de mama

O câncer ocorre através do resultado de falhas cumulativas em um dos mais organizados sistemas do organismo que é de controle multiplicativo de células. As células cancerosas apresentam característica instável conferindo malignidade às mesmas, influenciando primariamente o poder de invasão e disseminação que o tumor possui, podendo atingir limites adjacentes, sistema linfático e a corrente sanguínea (CUNHA *et al.*, 2010).

O número de mulheres que morrem por câncer de mama tem aumentado, e em nível mundial esta moléstia perde o lugar apenas para o câncer de pulmão (CANTINELLI *et al.*, 2006). Segundo dados levantados pelo Instituto Nacional de Câncer – INCA (2002), os principais sinais e sintomas de câncer de mama são nódulos na mama e/ou axila, dor mamária e alterações da pele que recobre a mama, como abaulamentos ou retrações com aspecto semelhante à casca de laranja.

De acordo com Smeltzer *et al.* (2006) os tumores de mama localizam-se, principalmente, no quadrante superior externo, e em geral, as lesões são indolores, fixas e com bordas irregulares, acompanhadas de alterações da pele quando em estágio avançado.

Essa doença pode ser controlada através da detecção precoce, na qual a lesão se restringe ao parênquima mamário, com um tamanho de no máximo três centímetros, permitindo o uso de recursos terapêuticos menos mutiladores e maior possibilidade de cura (INCA, 2004). Dentre os exames realizados para a detecção precoce de câncer de mama estão: o exame clínico de mamas (ECM), mamografia e o autoexame de mamas (AEM) (INCA, 2002).

A base do tratamento para o câncer é composta essencialmente pela intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, e atualmente, vem se desenvolvendo propostas de uso de nanoterapias (CUNHA *et al.*,2010).

A escolha da terapia para o câncer pode ocorrer com base na utilização de um método apenas, ou promovendo a combinação entre os métodos, visando à destruição das células cancerosas, porém, tanto a radioterapia como a quimioterapia, atingem células normais, fazendo com que o tratamento, muitas vezes, ocorra em intervalos regulares que possibilitem a recuperação das células normais do tecido acometido (LEMOS *et al.*,2004).

2.2 - Radioterapia

Radioterapia (RT) é a modalidade mais comum para o tratamento de câncer humano, cerca de 80% dos pacientes com câncer precisam ser submetidos à radioterapia em algum momento ou outro, seja para fins de curativo ou paliativo (PAUL *et al.*, 2011).

A radioterapia usa radiações gama no tratamento do câncer. A radiação ionizante danifica células do corpo humano, mas tecidos saudáveis possuem maior poder de regeneração que tecidos doentes. O objetivo da radioterapia é atingir o tumor com uma alta dose, danificando o mínimo possível os tecidos saudáveis vizinhos (MURAD & KATZ, 1996). Os efeitos das radiações em mamíferos vêm sendo estudados nos últimos 20 anos, através da análise de diferentes mecanismos, como danos e reparos ao ácido desoxirribonucléico (DNA), reações antioxidantes, apoptose e danos celulares, mutagênese e respostas imune adaptativa (LIU *et al.*, 2003). O tratamento com radiação em longo prazo provoca efeitos tanto ao sistema imune adaptativo quanto ao inato (LIU *et al.*, 2003).

Conforme Standish *et al.* (2008), em seu estudo realizado para avaliar o estado imune de mulheres que se submeteram ao tratamento de câncer de mama com RT, mostrou que as pacientes apresentaram déficits imunológicos, como a redução da secreção de

imunoglobulinas IgM, IgA e IgG ; linfopenia; diminuição no número total de células T; baixa atividade natural das células assassinas (NK) e baixos níveis de citocinas apoptóticas.

A exposição à radiação ionizante causa quebra de fita simples do DNA, rupturas de filamentos duplos, causando dano nas bases de DNA-proteína e ligações cruzadas no DNA genômico. Entre eles, as rupturas de filamentos duplos é a lesão mais crítica, que pode levar a instabilidade genômica e morte celular. Os diversos efeitos em células e tecidos, especialmente no DNA são bastante conhecidos através de estudos sobre células isoladas, tecidos e todo organismo após a exposição em altas doses (SCOTT, 2003; STANDISH, 2008).

O Cobalto caracteriza-se como uma radiação de baixo LET (Linear Energy Transfer) e vem sendo comumente utilizado em tratamento de RT. A radiação ionizante mesmo em baixas doses e com baixas taxas de doses, seus efeitos no sistema imune podem ser supressores ou estimulatórios (UNSCEAR, 2008).

Acredita-se que o aumento da resposta imune inata e específica é um dos mecanismos da eficácia da radiação de corpo inteiro com baixas doses (SAFWAT, 2000). As consequências do aumento da resposta imune inata são a ativação da resposta inflamatória caracterizada por infiltrados de neutrófilos e mudanças na ultraestrutura característica de macrófagos no tecido alvo. A ativação desses fagócitos caracterizada por aumento da atividade lisossomal e da enzima óxido nítrico sintase (NOS) caracteriza-se como uma resposta específica (LORIMORE *et al.*, 2001).

2.3 - Células de linhagem tumoral – adenocarcinoma de mama MDA-MB-231

A primeira linhagem celular humana foi utilizada em um laboratório de Baltimore há mais de 50 anos por George Gey (GEY GO *et al.*, 1952). Esta linhagem celular recebeu o nome de HeLa - após ser doada por Henrietta Lacks, a senhora de quem derivava a linhagem

celular, que tinha carcinoma cervical. A visão de Gey abriu o caminho para a cultura de células como a conhecemos hoje, permitindo que o seu desenvolvimento generalizado fosse uma importante ferramenta experimental na pesquisa do câncer. Um dos principais benefícios do uso de linhagens de células cultivadas na pesquisa de câncer é que eles oferecem um suprimento infinito de uma população de células relativamente homogêneas que é capaz de auto-replicação em meio de cultura celular padrão (HOLLIDAY & SPEIRS, 2011).

Em relação ao câncer de mama, a primeira linhagem celular a ser estabelecida foi BT-20 em 1958 (LASFARGUES & OZZELLO, 1958). No entanto, foram mais 20 anos, antes de estabelecer linhagens de câncer de mama, mais difundidas, incluindo a série MD Anderson (CAILLEAU *et al.*, 1978). Estas células foram isoladas por Cailleau e colegas em 1973, a partir de uma amostra de efusão pleural de um paciente com câncer de mama que morreu desta doença no Hospital Anderson (Houston, EUA) (CAILLEAU *et al.*, 1974).

Muito antes do surgimento das modernas técnicas de perfil molecular, os histopatologistas reconheceram que o câncer de mama era heterogêneo através de observações morfológicas. A classificação baseou-se nas seguintes medidas: tipo histológico, grau tumoral, estado dos linfonodos e presença de marcadores preditivos, como ER e, mais recentemente, receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). O desenvolvimento de perfis moleculares usando microarrays de DNA provou essa heterogeneidade, demonstrando através do perfil de expressão gênica e a expressão imunohistoquímica de ER α , receptor de progesterona (PR) e HER2 que o câncer de mama pode ser classificado em pelo menos cinco subtipos: luminal A, luminal B, HER2, Basal e normal (PEROU *et al.*, 2000).

Neste contexto, a linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (Figura 1) é classificada como um subtipo basal, os tumores basais são difíceis de tratar, são mais biologicamente agressivos e muitas vezes têm um mau prognóstico, esta linhagem celular

têm apresentado resistência a quimioterapia e radoterapia (HOLLIDAY & SPEIRS, 2011; FALCÃO *et al.*, 2015). Desse modo, como o fenótipo basal é caracterizado pela falta de expressão de ER α , PR e HER2, em alguns casos é referido como triplo negativo (HOLLIDAY & SPEIRS, 2011).

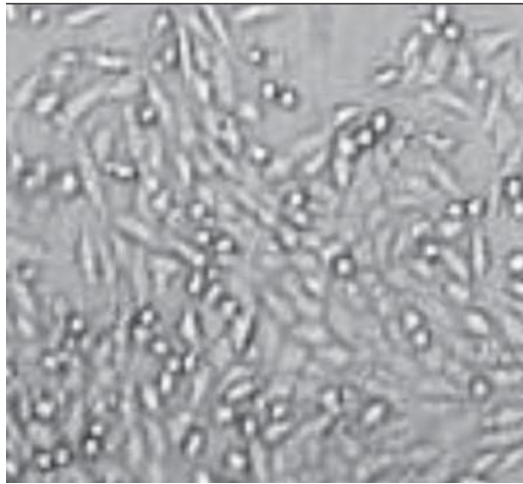


Figura 1 – Microscopia óptica células de MDA-MB-231

Fonte: (Falcão *et al.*, 2015)

A linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 é amais utilizada para o estudo experimental *in vitro* de câncerda mama hormono-independente. Verificou-se que estas células têm um rápido crescimento em meio de cultura enriquecido, em parte, por uma regulação autócrina de fatores de crescimento de células que se segregam para o meio. Eles possuem receptores de membrana abundantes para o factor de crescimento epidérmico (EGF) (MARTÍNEZ - CARPIO *et al.*, 1999). Estudos bioquímicos e genéticos com estas células têm contribuído grandemente para a pesquisa do câncer da mama e o desenvolvimento de drogas para ajudar a combatê-lo (HOLLIDAY & SPEIRS, 2011).

2.4 – PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMCS)

O Sistema Imunológico (SI), assim como os outros sistemas orgânicos, tem função fisiológica, atuando no sentido de manter a homeostasia do organismo, alterada por estímulos induzidos por fatores internos ou externos. A resposta imune contra fatores externos, incluindo patógenos, e fatores internos, como células tumorais, tem sido estudada ao longo dos tempos como sendo responsável pelos mecanismos de defesa. Para isto o SI conta com células e moléculas que atuam de maneira inespecífica, denominada imunidade inata, atuando como primeira linha de defesa (entenda-se: retorno à homeostasia) contra patógenos, enquanto que a permanência destes é capaz de estimular outras células – linfócitos – que se adaptam a estes estímulos externos, tornando-se mais específicas na tentativa de dar continuidade a homeostasia do Organismo (PINHEIRO, 2007).

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) são populações de células sanguíneas do SI que possuem um núcleo redondo. Essas células consistem em linfócitos (células T, células B e células NK) e monócitos (macrófagos) (DELVES, 2006). O procedimento de extração dessas células, é realizado com ficoll, um polissacarídeo hidrofílico, em que separa camadas de sangue por centrifugação em gradiente, que separará o sangue em uma camada superior de plasma, seguida de uma camada de PBMCs e uma fração inferior de células polimorfonucleares (tais como neutrófilos e eosinófilos) e eritrócitos (MIYAHIRA, 2014).

Essa população de células tem sido largamente utilizada por muitos cientistas que realizam pesquisas nos campos da imunologia (incluindo distúrbios auto-imunes), doenças infecciosas, doenças malignas hematológicas, desenvolvimento de vacinas, imunologia de transplantes e triagem de alto rendimento. Em muitos casos, as PBMCs são derivadas de bancos de sangue (MIYAHIRA, 2014).

2.5 – Radioprotetores

Os danos celulares são atribuídos primariamente aos efeitos maléficos dos radicais livres. Sendo assim, perdura há mais de seis décadas a busca por agentes protetores ideais que desempenhem o papel de diminuir esses danos oriundos da exposição à radiação. Estes compostos com propriedades de neutralizar estes radicais são considerados particularmente promissores como agentes radioprotetores (SANTOS, 2011).

Essas substâncias agem através da via “scavenging” de radicais livres produzidos pela radiação. Levando-se em consideração a vida extremamente curta dos radicais livres, estes agentes necessitariam estarem presentes no meio celular, preferencialmente, antes da exposição à radiação para neutralizar as propriedades destrutivas dos radicais livres (HOSSEINIMEHR, 2007). Os radio protetores mais conhecidos são os compostos aminotióis, como cisteína, cisteamina e AET (brometo de 2-aminoetilisotiuréia) (HALL, 2000; WEISS & LANDAUER, 2009).

Dessa forma, há necessidade de identificar compostos não tóxicos, efetivos e convenientes para proteção humana dos efeitos adversos da radiação ionizante. Diversos compostos têm sido testados para a sua eficácia radioprotetora. Todavia, todos esses compostos produzem efeitos colaterais indesejáveis, como náusea e vômitos e são considerados tóxicos nas doses necessárias para a radioproteção, o que limita o seu uso na prática médica (VIJAYALAXMI *et al.*, 2004; SHIRAZI *et al.*, 2007).

Atualmente, muitos compostos sintéticos testados apresentam um sucesso limitado, substâncias com propriedades antioxidantes que ocorrem naturalmente, como enzimas endógenas (glutaciona, superóxido dismutase, catalase) ou hormônios (melatonina), vitaminas (vitaminas C e E), carotenóides e flavonoides, têm despertado um interesse particular cada vez maior (WEISS & LANDAUER, 2009).

2.6- Abelha *Tetragona Clavipes* (Borá)

Os meliponíneos ou abelhas sem ferrão, estão presentes em grande parte das regiões tropicais da Terra, ocupando praticamente toda a América Latina e África, além do sudeste asiático e norte da Austrália. Estas abelhas constituem um grupo de abelhas formado por mais de 300 espécies conhecidas em todo o mundo, são caracterizadas por serem sociais e possuírem o ferrão atrofiado impossibilitando o seu uso. Aliás, essa é a razão pela qual são popularmente chamadas de abelhas sem ferrão, elas possuem uma grande importância no ecossistema brasileiro. Essas abelhas são os principais responsáveis pela polinização da grande maioria das espécies vegetais do nosso país. Além disso, seus produtos (mel, geoprópolis, etc.) são utilizados pela população rural como medicamentos e existe uma forte cultura popular do seu criatório e da apreciação de seus produtos. Os meliponíneos ou abelhas sem ferrão fazem parte da Subfamília *Meliponinae* da família *Apidae*, essa sub-família divide-se nas tribos *Meliponini* e *Trigonini* que compreendem 52 gêneros e as mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão identificadas (Freitas, 2003)

Devido ao seu papel como polinizadoras de culturas agrícolas e na produção de mel, cera e própolis, as abelhas sem ferrão possuem grande importância econômica, o que se observa principalmente em *Apis mellifera* e em outras abelhas eussociais (Kerr *et al.*,1996).

A espécie *Tetragona Clavipes* (Borá) é uma abelha sem ferrão bastante agressiva, principalmente nas horas quentes do dia, quando se defende, valentemente, mordiscando a pele ou se enrolando nos cabelos de quem tente chegar perto de sua colmeia. Apresenta deposição de própolis como comportamento defensivo. Nidifica em ocos de árvores, de preferência, vivas. Na região do Rio Xingu e Suiá missu, há grande quantidade de ninhos em Pequizeiros (Pequi). A abelha Borá é encontrada no Acre, no Amazonas, no Amapá, na Bahia, no Espírito Santo, em Goiás, no Maranhão, em Minas Gerais, no Mato Grosso do Sul, no

Mato Grosso, no Pará, no Paraná, no Rio de Janeiro e em São Paulo. O corpo da abelha Borá é alongado, com coloração marrom-escura. Possui as asas mais longas que a extensão do corpo. Lembra bastante a abelha Jataí, só que é maior (Freitas, 2003).

2.7 - Flavonoides e própolis

Os flavonoides têm sido alvo de grande interesse científico e terapêutico, devido as suas propriedades. Estes compostos representam uma classe de pigmentos encontrados nas plantas, derivados de benzo- γ -pirona (HAVSTEEN, 2002).

Os resultados obtidos através de estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação direta entre o consumo de frutas/vegetais e o risco diminuído de vários tipos de câncer, incluindo o de mama, cólon, laringe, pâncreas e próstata (ROSS & KASUM, 2002; RITHIDECH *et al.*, 2005). Esses possíveis efeitos protetores de flavonoides, juntamente com suas atividades antioxidativas e “scavenger” de radicais livres, observados tanto em estudos *in vivo* (ORSOLIC *et al.*, 2007; BENKOVIC *et al.*, 2008a) como *in vitro* (BENKOVIC *et al.*, 2008b), tem propiciado um interesse público sobre o consumo de flavonoides para seus potenciais benefícios à saúde.

A concentração de flavonoides nos vegetais de modo geral é baixa e a sua extração é extremamente trabalhosa, o uso de própolis tem sido uma alternativa atrativa, pois este produto das abelhas contém uma concentração mais alta de flavonoides, cerca de 25 – 30 % do seu peso seco (BENKOVIC *et al.*, 2008b).

A própolis é um produto resinoso encontrado na colméia (Figura 1), coletado por abelhas de várias fontes de planta e é utilizada pelas abelhas para selar eventuais aberturas na colméia e para eliminar possíveis invasores (BANSKOTA, 2001).



Figura 2- (A) Própolis depositada no interior da colméia; (B) deposição de própolis na tampa da colméia da abelha Borá (*Tetragona clavipes*)

Segundo Havsteen (2002), em uma amostra típica de própolis são encontrados cerca de 25 diferentes tipos de flavonoides em concentrações significativas, o que sugere que o extrato de própolis retém a maioria das propriedades bioquímicas comumente associadas aos flavonoides, isto é, efeito antioxidante e “scavenging” de radicais.

Neste sentido, tem aumento o interesse no cultivo de abelhas, devido seus produtos, dentre os produtos apícolas, a própolis, que vem sendo usada em medicina popular por séculos, se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas como atividades antimicrobiana (DAUGSCH *et al.*, 2007), anti-inflamatória, antioxidante, imunestimuladora, cicatrizante, anestésica e anticarcinogênica (PARK *et al.*, 1998), quanto pela possibilidade de aplicação nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Essas propriedades farmacológicas estão relacionadas a mais de 300 compostos que têm sido identificados em própolis (ISHIHARA *et al.*, 2009).

A investigação realizada na própolis originária da Europa e China possibilitou a identificação de vários tipos de flavonoides e ésteres de ácido fenólico (CAPE) (Figura 3), enquanto que a própolis brasileira é composta principalmente de artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), terpenóides e ácido p-cumárico (CHEN *et al.*, 2004).

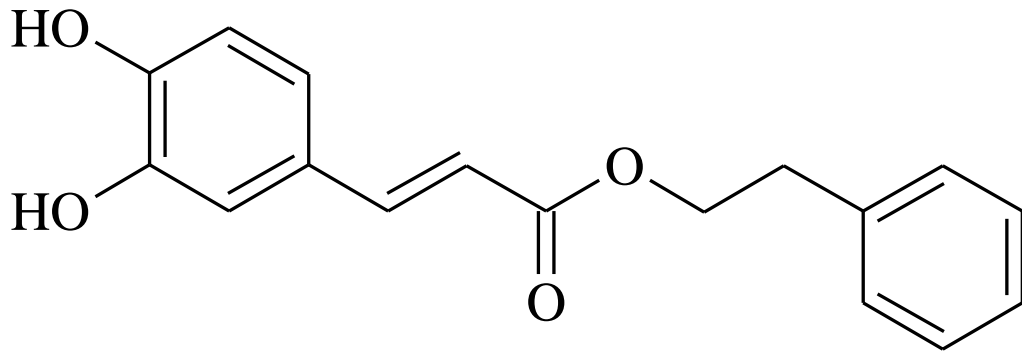


Figura 3 - Estrutura química do CAPE

Fonte: (WU *et al.*, 2011)

Artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é o principal componente biologicamente ativo Fenólico encontrado na própolis verde, coletado da planta *Baccharis dracunculifolia* no Sudeste do Brasil (PARK *et al.*, 2004). Artepillin C possui ação antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antigenotóxica, antiangiogênica e propriedades anticancerígenas (MATSUNO *et al.*, 1997; WATANABE *et al.*, 2011). A estrutura deste derivado de ácido hidroxicinâmico é apresentada na Figura 4.

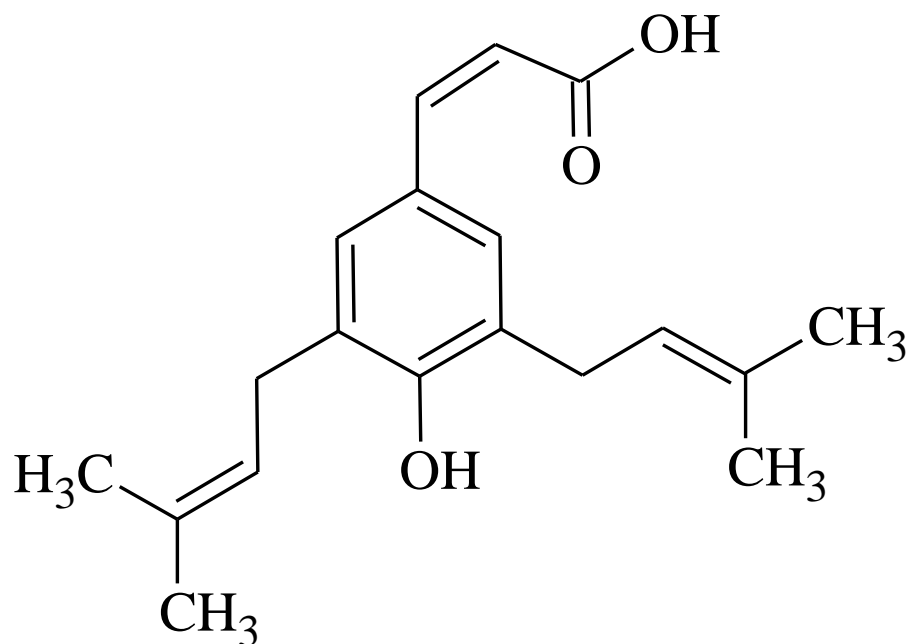


Figura 4 - Estrutura química da artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico)

Fonte: (SZLISZKA *et al.*, 2012)

No entanto, a própolis procedente da região sul do Brasil não contém artepelinina C na sua composição, mas é relativamente rica em flavonóides, incluindo galangina, apigenina, crisina e pinocembrina (LI *et al.*, 2007). A principal origem botânica da própolis dessa região foi identificada como sendo *Myrceugenia euosma* (Myrtaceae), um cultivo abundante no sul do Brasil, quase na fronteira com o Uruguai. (ITO *et al.*, 2001).

2.7- Interferências da natureza na qualidade e na produção da própolis

Os componentes químicos presentes na própolis são determinados principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA *et al.*, 2004). Entretanto, a composição da própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade (SFORCIN *et al.*, 2000).

De acordo com a investigação realizada por Silici & Kutluca (2005) existem variações na composição entre amostras de própolis coletadas em uma mesma região, por diferentes raças de *Apis mellifera*. Como consequência desta composição química diferenciada da própolis, ocorre também uma variação nas suas atividades farmacológicas. Não só a composição química da própolis é determinada pelas características da vegetação da região, mas também as reservas de pólen e mel (MENEZES, 2005).

Outros fatores bem como as diferenças genéticas das abelhas que coletam a resina e a origem geográfica das substâncias nela presentes tornam a composição química da própolis complexa (BARBOSA, 2009). Hernandez *et al.* (2010), inferem que duas ou mais espécies vegetais contribuem para a produção da própolis cubana. Por isso, embora seja um produto de origem animal, alguns compostos químicos da própolis são derivados da fonte botânica utilizada pelas abelhas, principalmente aqueles com ação biológica (SALATINO *et al.*, 2005).

Segundo Dausch *et al.* (2007) um novo tipo de própolis de coloração vermelha foi verificado em colméias encontradas ao longo do litoral e dos rios do Nordeste do Brasil, apresentando características físico químicas e biológicas diferenciadas das demais já estudadas.

De acordo com a origem botânica e a composição química, a própolis brasileira foi classificada em diferentes grupos. Porém, essa classificação ainda é subestimada, uma vez que as abelhas podem coletar resina numa grande variedade de plantas (SILVA, 2008). Devido à ampla diversidade vegetal existente no Brasil para a retirada de resina e produção da própolis, até agora apenas algumas variedades tiveram a origem botânica identificada (PARK *et al.*, 2002).

De acordo com Park *et al.* (2004), o alecrim, assa-peixe, aroeira e eucalipto são alguns exemplos de onde as abelhas buscam a matéria prima para a produção da própolis. Segundo Aguero *et al.* (2010), as fontes de resinas e exsudatos vegetais disponíveis variam de região para região e dependem do clima, solo e outros fatores.

As abelhas desenvolvem o mecanismo de polinização cruzada entre as flores de algumas espécies de árvores que dependem desse processo para o seu desenvolvimento, nesse sentido, a extinção de espécies de abelhas causada pelo desmatamento, poderá causar, em longo prazo, um desequilíbrio nas populações destas espécies que são interrelacionadas (WITTER *et al.*, 2009).

Segundo Antunes *et al.* (2012) inúmeros fatores contribuem para a redução populacional de abelhas nativas, dentre os quais se destacam: a destruição de colônias na colheita do mel, desmatamento, principalmente árvores de grande e médio porte que possuem troncos ocos, os quais servem para a sua nidificação e falta de recursos florais.

Nessa perspectiva, é necessário o controle através do resgate e salvamento de abelhas nativas, dessa forma, é possível minimizar os impactos ambientais decorrentes de atividades de supressão da vegetação, seja para implantação de reservatórios de usinas hidrelétricas ou outros empreendimentos que demandem a retirada de árvores nativas, contribuindo para que os polinizadores permaneçam na área do entorno do reservatório e mantendo um número mínimo de colônias na população intercruzante e a variabilidade genética na área de reprodução (INTERCOOP, 2013).

Dessa forma, estudos visando à identificação da fonte vegetal e caracterização de compostos biologicamente ativos da própolis associadas às suas atividades biológicas e terapêuticas, têm recebido uma atenção especial nestes últimos anos (DAUGSCH *et al.*, 2007). Sendo assim, a conservação das espécies vegetais vizinhas a colméia, possui um papel importante na determinação da composição da própolis produzida pelas abelhas e que apresentam diversos potenciais farmacológicos.

3 –OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade celular da linhagem de adenocarcinoma mamário MDA MB-231 e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) antes e após a exposição à radiação gama com Cobalto-60 sem e com associação de concentrações de extrato aquoso de própolis da abelha *Tetragona clavipes*, considerando a cinética de tempo.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do extrato da própolis de *Tetragona clavipes* sobre a viabilidade celular de linhagem de células do sangue periférico humano (PBMC) em estudo *in vitro*, irradiadas com doses de radiação ionizante pré-estabelecidas.

- Avaliar o efeito do extrato da própolis de *Tetragona clavipes* sobre a viabilidade celular de linhagem de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) radioresistente, irradiadas com doses de radiação ionizante pré-estabelecidas.

- Avaliar a presença classes de substâncias do grupo fenilpropanóides (flavonóides e taninos); terpenóides (esteróides e triterpenóides) e glicosídeos (Saponinas).

CAPITULO I

RADIOPROTEÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO ATRAVÉS DE EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS DE *TETRAGONA CLAVIPES*

RESUMO

O câncer de mama adquiriu uma importância notável nos últimos anos, sendo motivo de séria preocupação por parte das políticas de saúde pública devido a sua alta incidência e mortalidade, especialmente no Brasil. Dentre os tratamentos para o câncer de mama a radioterapia e quimioterapia apresentam limitações devido aos seus efeitos tóxicos nos tecidos normais bem como alteração no sistema imunológico. É promissor o desenvolvimento de drogas de origem natural que induzem proteção ao sistema imunológico de pacientes de radioterapia e quimioterapia, se estes compostos venham a inibir a depleção do número de células circulantes. O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença ou não de compostos fenólicos no extrato aquoso da própolis qual seu efeito sobre a viabilidade celular de células mononucleadas do sangue periférico humano (PBMC). Grupos controle (GC), controle irradiado (GCI), irradiado exposto à própolis de *Tetragonaclavipes* (GIE), em triplicata, foram estabelecidos. O extrato foi preparado a partir do triturado da amostra de própolis e água. Foi realizado ensaio de prospecção química em tubos. As células foram irradiadas com baixa LET (Linear Energy Transfer) com cinética de doses pré-determinada de 2 e 5 Gy e suplementadas com extrato de própolis nas concentrações de 0,5%, 1%, 5% e 10%. As coletas pós-irradiação foram realizadas nos tempos pré-estabelecidos de 24, 48 e 72 h. Teste de viabilidade pela técnica do MTT foi aplicado. Este estudo demonstrou que em cinética de doses de irradiação ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade celular em PBMC. No entanto, em GIE, exposta ao extrato da própolis observou-se um aumento da viabilidade celular, principalmente nas concentrações de 5 e 10% do extrato em cultura, mesmo a 5 Gy. Os achados demonstram que PBMC *in vitro* irradiadas exposta a extrato aquoso da própolis de *Tetragonaclavipes* encontram uma proteção ao agente exógeno. Esse estudo abre uma perspectiva relevante acerca do papel da própolis como agente adjuvante na proteção do sistema imunológico de pacientes submetidos à radioterapia de mama.

Palavras chaves: Câncer, radiação, extrato, própolis e PBMC.

ABSTRACT

Breast cancer has acquired a notable importance in recent years, and is a serious concern on the part of public health policies due to its high incidence and mortality, especially in Brazil. Among the treatments for breast cancer, radiotherapy and chemotherapy have limitations due to their toxic effects on normal tissues as well as changes in the immune system. It is promising the development of drugs of natural origin that induce protection to the immune system of radiotherapy and chemotherapy patients, if these compounds will inhibit the depletion of the number of circulating cells. The present study aimed to evaluate the presence or absence of phenolic compounds in the aqueous extract of propolis and its effect on the cellular viability of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Control groups (GC), irradiated control (GCI), irradiated exposed to propolis of *Tetragona clavipes* (GIE), in triplicate, were established. The extract was prepared from the crushed sample of propolis and water. A chemical prospecting test was carried out in tubes. Cells were irradiated with low LET (Linear Energy Transfer) with pre-determined dose kinetics of 2 and 5 Gy and supplemented with propolis extract at concentrations of 0.5%, 1%, 5% and 10%. Post-irradiation collections were performed at the pre-established times of 24, 48 and 72 h. Feasibility test by the MTT technique was applied. This study demonstrated that in kinetics of irradiation doses there was a significant decrease in cell viability in PBMC. However, in GIE, exposed to the propolis extract, an increase in cell viability was observed, especially at concentrations of 5 and 10% of the extract in culture, even at 5 Gy. The findings demonstrate that irradiated PBMC in vitro exposed to the aqueous extract of the propolis of *Tetragona clavipes* find a protection to the exogenous agent. This study opens a relevant perspective on the role of propolis as an adjuvant in protecting the immune system of patients undergoing breast radiotherapy.

Key words: Cancer, radiation, extract, propolis and PBMC.

1 - INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um tumor maligno hormono-dependente, responsável pela maior parte da mortalidade relacionada ao câncer em mulheres. Enquanto avanços no tratamento e prevenção do câncer de mama têm surgido ao longo da última década, a resistência a múltiplas drogas tem sido uma das principais causas do agravamento desta morbidade como reflexo da falha no tratamento radioterápico e quimioterápico (ALLER *et al.*, 2009).

A radioterapia representa parte integrante do tratamento primária conservador do carcinoma mamário, com o objetivo de se obter um melhor controle tumoral *in situ* (ZUCALI, 1992; LIU, 2009). Segundo Perez *et al.* (2001), os protocolos conformacionais 3D utilizados no planejamento para o tratamento de câncer de mama, consideram que a exposição da mama deve ser realizada em dois campos opostos tangenciais, em frações de 1,8 a 2,0 Gy diários, se estendendo por cinco dias semanais, em múltiplas frações até o acúmulo de 45 a 50 Gy.

É promissor o desenvolvimento de drogas de origem vegetal que induzem a radioproteção ao sistema imunológico de pacientes sob radioterapia, se estes compostos venham a inibir a alteração fenotípica celular e a depleção do número de células circulantes. Assim, torna-se importante identificar compostos não tóxicos, efetivos e de baixo custo que possam servir de proteção imunológica em pacientes submetido ao tratamento de câncer, a fim de evitar doenças oportunistas.

Muitos compostos sintéticos estão sendo testados e apresentam um interesse particular cada vez maior, porem apresentam um sucesso limitado, Essas substâncias possuem propriedades antioxidantes que ocorrem naturalmente, como enzimas endógenas (glutathione, superóxido dismutase, catalase) ou hormônios (melatonina), vitaminas (vitaminas C e E), carotenóides e fitoquímicos (flavonóides, curcumina) (WEISS & LAUDAUER, 2009). Esses

compostos em geral são tóxicos nas doses necessárias para a radioproteção, o que limita o uso clínico (VIJAYALAXMI *et al.*,2004; SHIRAZI *et al.*,2007).

A própolis é uma mistura resinosa coletadas por abelhas de diversas partes das plantas e é utilizada para selar eventuais aberturas na colméia e para eliminar possíveis invasores (SANTOS, 2011). É conhecida por conter uma variedade de compostos químicos como esteróides ácidos fenólicos, ésteres de ácidos fenólicos, flavonoides e terpenoides, como CAPE e Artepillina C (HUANG *et al.*,2014). O principal componente químico presente na própolis é o éster fenético ácido cafeico (CAPE). É comprovado que este composto possui atividades biológicas importantes, incluindo antimicrobiana, antiviral, antioxidante, antiinflamatória e anti-cancer (PARK *et al.*, 2009).

A suplementação de própolis com tratamento de radioterapia oferece uma proteção bastante mensurável contra danos ao DNA causados pelas radiações ionizantes em leucócitos de pacientes durante o tratamento de radioterapia (EBEID *et al.*, 2016). Ademais, a atividade imunológica proporcionada pelo uso da própolis e compostos relacionados aumenta a regeneração hematopoiética e sobrevivência após indução por radiação (ORSOLIC *et al.*, 2007).

Torna-se interessante a abordagem de utilização da própolis como terapia adjuvante na modulação da quimiotaxia celular associado à liberação da radiação *in situ*, no tratamento de tumores localizados em áreas de compressão. O monitoramento do tamanho do tumor, bem como a inibição de receptores é primordial para se determinar o prognóstico do tratamento (POTTI *et al.*, 2002). A investigação sobre a ação radioprotetora da própolis tem aumentado e o conhecimento de suas propriedades tem sido estudada extensivamente *in vivo e in vitro* ao longo do tempo (BENKOVIC *et al.*, 2009).

O presente trabalho propõe investigar o efeito do extrato da própolis de *Tetragona clavipes* sobre a viabilidade celular de linhagem de células do sangue periférico humano (PBMC) em estudo *in vitro*, irradiadas com doses de radiação ionizante pré-estabelecidas.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS (EAP)

A própolis bruta foi obtida na Fazenda Poranga, localizada no município de Itacoatiara, Amazonas – Brasil, proveniente da colméia de espécie de abelha *Tetragona clavipes*. A amostra de própolis foi levada ao laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas e mantida sobre refrigeração a 4 °C. Posteriormente foi preparado o extrato da própolis, conforme descrito por Matsushige *et al.* (1996) com modificações.

O extrato de própolis foi preparado a 20% da seguinte forma: em um Becker foi adicionado 500 mL de água deionizada e 100 g de própolis bruta triturada em liquidificador, e guardado por 24h. A mistura foi aquecida em banho termostaticado com água a 80°C, por duas horas. Posteriormente essa solução foi turbolizada em liquidificador e filtrada em funil de kitassato. O filtrado foi seco em banho maria durante 48h. Finalmente, o pó resultante foi ressuspenso em meio RPMI nas concentrações 0,5%, 1%, 5%, 10%.

2.2- LINHAGENS PRÉ-ESTABELECIDAS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

As PBMCs foram obtidas de voluntários. As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos gentamicina (50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e estreptomicina (500 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), em frascos de cultura T-25 em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C.

2.3- SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS PBMC

As PBMCs de pacientes foram separadas segundo procedimento descrito por Gazzinelli *et al.* (1983). O sangue heparinizado foi aplicado em tubos de 15 mL,

siliconizados, contendo uma mistura de Ficoll diatrizato, obtida comercialmente (Organon Teknika Corporation; Durham, NC), na proporção de uma parte de Ficoll - diatrizato para duas partes de sangue. A preparação foi submetida à centrifugação por 30 min, a 1.400 rpm à temperatura ambiente. Ao final da centrifugação obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre o Ficoll e o plasma, o qual foi cuidadosamente removido com o auxílio de pipeta Pasteur e transferido para tubos de fundo cônico de 15 mL estéreis (Falcon nº 2070). O volume foi completado para 15 mL com solução RPMI-1640 (Gibco®) não suplementado e fez-se outra centrifugação (10 min, 1.200 rpm). As células foram lavadas por mais duas vezes (10 min, 1.200 rpm). Ao final, uma alíquota da suspensão de células foi coletada e diluída (1:20) em tubo Eppendorf contendo 90 µL de solução de Turck, e o número de células determinado por contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico. A concentração de células foi ajustada para uma suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ células/mL⁻¹ de RPMI-1640 suplementado. Toda manipulação das células foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (Biological Cabinet BBL modelo 60474).

2.4- CONTROLE

O controle foi feito com culturas de PBMCs não irradiadas e que não receberam o extrato aquoso de própolis, mantidas em cultura como descrito. Utilizou-se um controle positivo PHA – Fitohemaglutinina, responsável por induzir a clonogênese de células.

2.5- TRATAMENTO DAS CULTURAS COM PRÓPOLIS

As concentrações do extrato aquoso de própolis utilizada foram de 0,5%, 1%, 5% e 10%, da qual foi adicionado 100 uL diretamente nas culturas de PBMCs irradiadas e não irradiadas, cultivadas em triplicata.

2.6- RADIAÇÃO E CINÉTICA DE DOSE

As garrafas T-25 contendo as células foram vedadas com parafilme e transportadas dentro de um frasco plástico rígido tampado, previamente descontaminado com álcool a 70%, até o local de irradiação. Uma placa de 4 cm de material tecido equivalente foi colocada abaixo do frasco T-25, bem como o meio de cultura foi preenchido até 5 mm de altura, em relação à superfície das células aderidas.

Este procedimento foi necessário para alcançar o equilíbrio eletrônico e garantir as doses prescritas nas células aderentes. Frascos T-25 de cultura confluenta foram submetidos à irradiação com Co-60, no Laboratório de Irradiação Gama – LIG do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, Universidade Federal Minas Gerais - UFMG. Após a exposição, as células retornaram à incubadora de CO₂. Foram utilizadas doses de 2 e 5 Gy para células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

2.7- CINÉTICA NO TEMPO

Os frascos de culturas in vitro que foram submetidos às doses supracitadas retornaram para estufa de CO₂ a 37°C após a irradiação. Alíquotas de células irradiadas e não irradiadas (controle) foram coletadas em tempos pré-estabelecidos, em 24, 48 e 72 h pós-irradiação, respectivamente.

2.8- AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE

Sumariamente, o ensaio do MTT (metil tiazoltetrazólio - um sal amarelo que, ao ser absorvido pelas células, foi metabolizado no interior das mitocôndrias), este foi utilizado para a verificação da viabilidade celular, ou seja, as células que estiveram viáveis foram capazes de formar os cristais de formazan através da ação das desidrogenases. Este sal é transformado em cristais púrpura denominados cristais de formazan. Os cristais formados foram

visualizados por microscopia óptica e a viabilidade celular foi mensurada através da leitura de densidade óptica usando-se um aparelho leitor de ELISA com comprimento de onda de 595 nanômetros. A capacidade anti-oxidante (antioxidative capacity – AOC) das amostras cultivadas, avaliadas por diacetato de hidrocloreofluoresceína, foram realizadas em células obtidas das de culturas de células no tempo 0 (zero) (antes do tratamento com radiação de baixa LET).

Das triplicatas de alíquotas de distintos tempos de irradiação, foram plaqueadas 100 μL de amostra em cada poço, em placas de ELISA fundo plano (12×8) – e mantidas em incubação por 8 h. Foram adicionados 20 μL (5 mg.mL^{-1}) de MTT em cada poço e as amostras retornaram para a incubadora onde permaneceram metabolizando o MTT por 4 h. Após a metabolização, 80 μL foram descartados de cada poço e foram adicionados 80 μL de isopropanol (0,04 M). As placas foram incubadas por mais 18 h. A viabilidade celular foi mensurada pela medida da densidade óptica (DO) utilizando a leitora de análise de imunoabsorção por ligação enzimática (enzyme linked immunosorbent assay – ELISA) no comprimento de onda de 595 nm. A primeira fileira corresponde ao branco da leitora de ELISA. As placas foram lidas com o comprimento de onda de 595 nm em aparelho de ELISA Elx800. O teste de viabilidade celular pelo MTT teve como princípio a verificação da viabilidade e quantificação da proliferação celular baseada na clivagem do sal tetrazólio (MTT). Após a incubação das células submetidas a esse ensaio, formou-se uma solução corante, e dessa forma foi possível correlacionar a absorbância com o número de células viáveis.

2.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de densidade óptica obtidos por meio do teste de MTT em células PBMC, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de

significância. Neste contexto, foi avaliada a interação entre as concentrações de extrato aquoso (antes – controle sem PHA; concentração 0,5; 1; 5 e 10%) e o tempo de 24, 48 e 72 horas e fez-se o desdobramento da interação para cada dose de radiação (2 e a 5Gy). Realizaram-se as análises estatísticas no software Genes.

3 - RESULTADOS

O ensaio de viabilidade celular pelo Metil Tiazol Tetrazólio – MTT foi realizado para determinação da viabilidade e clonogênese celular. O teste teve como fundamentação a clivagem do sal tetrazólio (MTT- um sal amarelo que, ao ser absorvido pelas células, foi metabolizado no interior das mitocôndrias) e foi utilizado para a verificação da viabilidade celular, ou seja, células que se apresentaram viáveis foram capazes de formar os cristais de formazan (através da ação das desidrogenases. Basicamente, este sal foi transformado em cristais púrpura denominados cristais de formazan. Após a incubação das células submetidas a esse ensaio, formou-se uma solução corante, que medida através do leitor de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), e dessa forma foi possível correlacionar a absorbância através da densidade óptica apresentada com o número de células viáveis (Figura 1).

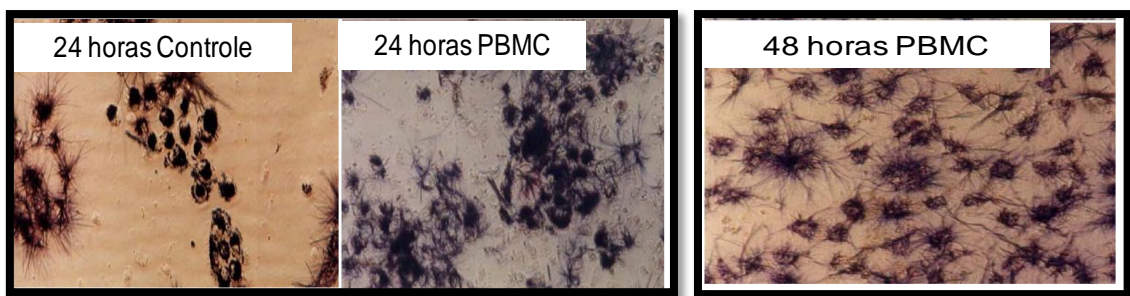


Figura 1 - Campos ópticos arbitrários em microscopia inversa (800 X) de PMBC em cultura, em cinética de tempo para o teste de MTT.

Foi feita a avaliação qualitativa da viabilidade celular de PBMC expostas ao extrato da própolis da espécie de abelha *Tetragona clavipes*, em 4 concentrações previamente determinadas, cujas amostras foram coletadas numa cinética de tempo de 24, 48 e 72 h após a incubação com o extrato nas concentrações de 0,5, 1%, 5% e 10% em comparação com controle (células que não receberam EPA) e controle com PHA. Utilizou-se a

Fitohemaglutinina – PHA que é uma proteína mucofitohemaglutinina retirada de uma variedade do *Phaseolus vulgaris*. Esta possui excelente grau de atividade mitogênica, bastando 0,1 - 0,2 ml para estimular a diferenciação básica e conseqüente mitose de linfócitos T presentes em 1 ml de sangue.

Ao avaliar o comportamento do desdobramento entre tratamento com extrato dentro de cada tempo (Tabela 1), verificou-se que as médias de densidade óptica diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05\%$). Neste sentido, não houve diferença significativa a concentração que apresentou melhor influência em todos os tempos foi a 10%, pois entre as médias de densidades óptica das células submetidas ao EAP a 10% e as células submetidas ao PHA (controle positivo), ou seja, as células apresentaram o mesmo comportamento tanto na presença de PHA, proteína mitogênica que estimula a proliferação de linfócitos T, como na presença de extrato de própolis a 10%.

Em relação à decomposição dos tempos dentro de cada tratamento com extrato não houve diferença significativa entre o tempo de exposição ao extrato (Tabela 1). O valor das médias de densidade óptica não aumentou significativamente ($p < 0,05\%$) nesse tempo com relação aos demais intervalos de tempo e com os grupos de culturas celulares que não foram suplementadas com própolis ou receberam menor concentração de própolis.

Tempo	Viabilidade celular (DO - nm)						Médias tratamentos dentro tempo (DO - nm)
	# Cont.	PHA	Ext. 0,5%	Ext. 1%	Ext. 5%	Ext. 10%	
24	1,38cD	2,92aA	0,99cE	1,73cC	2,62bB	3,10bA	2,12
48	1,91bD	2,95aB	1,30bE	2,48bC	2,92aB	3,25abA	2,46
72	2,42aC	2,98aB	2,52aC	2,87aB	2,95aB	3,30aA	2,84
Médias tempos dentro tratamento (DO - nm)	1,90	2,94	1,60	2,36	2,83	3,21	
*DMS tratamento dentro tempos			DMS tempos dentro tratamento				
0,1967			0,1599				

Tabela 1- Perfis de viabilidade celular em densidade óptica - DO na cinética no tempo de 24, 48 e 72 h, determinados pelo teste de MTT em cultura *in vitro* de PBMCs antes e após a exposição às concentrações de 0,5%; 1%; 5% e 10% de extrato aquoso de própolis (EAP). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si. *DMS – Diferença mínima significativa. # células que não receberam tratamento com EAP.

A Tabela 2 mostra os perfis de viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT, para culturas de PBMCs *in vitro*, de suspensão homogeneizada de células de frascos (T-25) de cultura de PBMCs que foram irradiadas com 2Gy. Os dados mostram que já nas 24hs há uma diminuição significativa ($P < 5\%$) de sobrevivência das células PBMCs anterior ao tratamento com a própolis em relação às culturas de células que foram suplementadas com extrato da própolis.

Verifica-se na tabela 2 o efeito tóxico da radiação sobre as células PBMC's, é possível observar através da comparação do desdobramento dentro de cada tempo no controle (as células que foram submetidas apenas a radiação sem extrato da própolis) que houve diferença significativa representando pelas letras maiúsculas nas linhas na média de densidade óptica das células PBMC's.

Considerando ainda o desdobramento do tempo dentro de cada tratamento, o resultado da viabilidade celular submetida à concentração a 10% não apresentou diferença significativa entre as médias das densidades ópticas. No entanto, em relação ao desdobramento do tempo dentro de cada tratamento nota-se que houve diferença significativa em todas as concentrações de extrato.

Tratamento	Viabilidade celular (DO - nm)			Médias tratamentos x tempos (DO - nm)
	24	48	72	
#Controle	0,46 cAB	0,59 cA	0,39bB	0,48
Extrato 1%	0,77bB	0,94bA	0,43bC	0,71
Extrato 10%	1,43aA	1,39aA	1,35aA	1,39
Médias tempos x tratamentos (DO - nm)	0,88	0,97	0,72	
*DMS tempos x tratamentos				DMS tratamento x tempos
0,1531				0,1531

Tabela 2 - Perfis de viabilidade celular em densidade óptica – DO na cinética de tempo de 24, 48 e 72 hs, determinados pelo teste de MTT de cultura in vitro de PBMCs, antes e após a exposição à radiação na dose de 2 Gy e submetidas as concentrações de 1% 10% de extrato aquoso de própolis (EAP). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL ao diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *DMS – Diferença mínima significativa. # Células que não receberam tratamento com EAP e foram somente irradiadas.

A Tabela 3 mostra os valores médios dos perfis de viabilidade celular nas culturas celulares de PBMCs submetidas à exposição combinada com irradiação e própolis. O nível de viabilidade antes do tratamento com a própolis ou com radiação isolada apresentou dano genotóxico menor do que aquelas somente irradiadas, tanto nas concentrações mais baixas (1%) associadas a 5 Gy como nas mais altas (10%) associadas a mesma dose de radiação.

Conforme apresentado na Figura 3, os níveis de sobrevivência das células PBMCs nos três grupos de culturas celulares que receberam somente tratamento com radiação reduziu significativamente ($p < 0,05\%$). Em relação ao nível de sobrevivência nos grupos de células

que receberam radiação de 5 Gy, e expostas com o extrato, a viabilidade foi significativamente mais elevada do que os níveis do controle ($p < 0,05\%$). Considerando os intervalos de tempo pré-estabelecidos foi observada diferença não significativa no crescimento celular das culturas de células que receberam o tratamento de radiação mais própolis e as que receberam PHA $1\mu\text{mL}$.

Tratamento	Viabilidade celular (DO - nm)			Médias tratamentos x tempos (DO - nm)
	24	48	72	
#Controle	0,48cB	0,36cB	0,86bA	0,57
Extrato 1%	0,74bA	0,81bA	0,57cB	0,70
Extrato 10%	1,03aB	1,23aA	1,32aA	1,19
Médias tempos x tratamentos (DO - nm)	0,75	0,80	0,91	
*DMS tempos x tratamentos				DMS tratamento x tempos
	0,1396			0,1396

Tabela 3 - Perfis de viabilidade celular em densidade óptica – DO na cinética de tempo de 24, 48 e 72 h, determinados pelo teste de MTT em cultura in vitro de PBMCs, antes e após a exposição à radiação nas doses de 5Gy, e submetidas as concentrações de 1% e 10% de extrato aquoso de própolis. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.* DMS-Diferença mínima significativa. # Células que não foram tratadas com EAP e foram irradiadas com doses de 5 Gy de radiação.

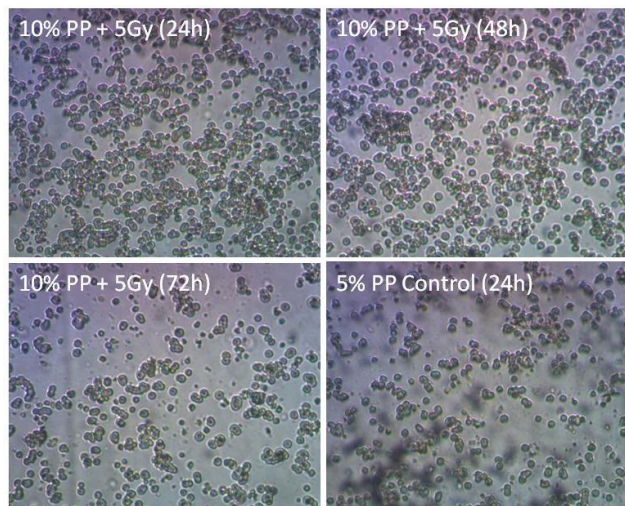


Figura 2 - Campos ópticos arbitrários em microscopia inversa (800 X) da PMBC em cultura, em concentrações distintas de própolis (PP), dose de irradiação e cinética de tempo.

A Figura 3 ilustra alguns campos ópticos arbitrários tirados à microscopia inversa (800 X) da PMBC em frascos T-25 em cinéticas de tempo distintos, para controle e irradiação com 5 Gy. Os campos ópticos representam a viabilidade das células PBMC irradiadas submetidas ao extrato de própolis, é possível perceber que as células continuam vivas mesmo quando receberam radiação e associação de extrato de própolis 10%. Sendo assim, foi demonstrado que as células permanecem viáveis mesmo na presença de radiação e foram capazes de formar cristais de formazan em torno das mesmas pela clivagem do sal tetrazólio (Figura 3).

4 - DISCUSSÃO

O presente estudo foi proposto para investigar a influência da própolis brasileira, particularmente procedente de Itacoatiara-Amazonas sobre os danos citotóxicos, bem como sobre o potencial proliferativo de células normais PBMCs irradiadas com ^{60}Co .

Em relação às células PBMCs não irradiadas, o tratamento combinado com a própolis (10%) estimulou o crescimento celular principalmente quando incubadas por 72 h, sendo assim, a melhor concentração detectada nesse estudo foi a 10%. Neste sentido, a própolis pode ser uma alternativa terapêutica importante, do ponto de vista econômico, e farmacologicamente eficiente, facilmente obtido, apresentando propriedades farmacêuticas (Alencar *et al.*, 2005).

Falcão *et al.* (2015) demonstraram que as células PBMC, sensíveis à radiação, apresentam diminuição da viabilidade a 2 Gy e fortemente a 10 Gy em ambas as taxas de dose. Esse estudo corroborou com a presente pesquisa, pois as células do sangue humano apresentaram radio sensibilidade em todas as doses de radiação de raio gama oriundas de ^{60}Co utilizadas neste trabalho. Neste contexto, sabe-se que durante o tratamento de radioterapia, procedimento em que o indivíduo é submetido a doses de radiação ionizante para o tratamento do câncer, o mesmo pode entrar em estado de imunossupressão, devido à morte das células (PBMC's) que estão envolvidas diretamente na defesa do organismo.

Logo, o ensaio do MTT permitiu observar que a própolis nas concentrações testadas mostrou um efeito protetor, diminuindo a quantidade de danos radioinduzidos nas células PBMC's em relação aos respectivos controles, nos 2 parâmetros analisados (Tabelas. 2 e 3). Dessa forma, os resultados demonstraram que o extrato da própolis apresenta efeito radioprotetor sobre as células PBMCs frente aos danos causados pela interação da radiação ionizante com os componentes biológicos celulares. Esse extrato da própolis foi detectado em

todas as concentrações utilizadas, porém com maior efeito quando as células foram submetidas à concentração de 10% de EAP, dessa forma, é possível notar que quanto maior foi o teor de própolis, maior foi o efeito protetor sobre as células (Figura 2).

Embora o mecanismo exato da ação da própolis na radioproteção não está totalmente elucidado, vários estudos têm mostrado que as propriedades farmacológicas da própolis são atribuídas, principalmente, à presença de flavonoides pela sua ação como “scavengers” de radicais livres (RITHIDECH *et al.*, 2005). Tais “scavengers” de radicais livres provavelmente têm papel chave em radioproteção, pois a radiação induz toxicidade que é medida principalmente através da geração de radicais livres e sua ação no DNA (MONTORO *et al.*, 2011).

De acordo com Ebeid *et al.* (2016) a suplementação de própolis com tratamento de radioterapia minimizou os danos causados ao DNA por radiação ionizante em leucócitos de pacientes com câncer de mama e inibe a superexpressão de RRM2 (ribonucleótideo redutase 2). Além disso, a própolis tem efeitos benéficos sobre a capacidade antioxidante do soro e melhora a assimilação de ferro pelo organismo e a eficiência de regeneração de hemoglobina.

A radiação ionizante é amplamente utilizada para tratamento de câncer de mama. No entanto uma das limitações do uso de radiação são os seus efeitos tóxicos nos tecidos normais (FALCÃO *et al.*, 2015). Através desses dados, pode-se dizer que a própolis mostrou um efeito estimulador de proliferação de células PBMCs.

5 - CONCLUSÃO

Nesta investigação, a associação da exposição à própolis e radiação, não houve diminuição significativa na viabilidade das células PBMCs nos tempos de 24, 48 e 72h. Mas em relação a concentração de própolis de *Tetragona clavipes* a concentração de extrato aquoso à 10% ofereceu uma proteção contra danos causados por radiação ionizante em PBMC.

Dessa forma, concluiu-se que o tempo em que as células ficaram expostas ao EAP não influenciou no efeito do extrato sobre as células, ou seja, a concentração a 10% apresentou o mesmo efeito sobre a viabilidade das células PBMC em relação ao tempo de exposição, e também apresentou um melhor resultado quando comparada ao controle que não recebeu extrato e as concentrações de extrato de própolis inferiores utilizadas neste trabalho.

Sendo assim, o presente estudo pode servir como base para o potencial uso de própolis em combinação com o tratamento que envolve o uso de radiação ionizante, a fim de proteger as células imunológicas circulantes da indução de dano genotóxico causados por radiação. Estudos sobre os constituintes responsáveis por esse papel radioprotetor da própolis são necessários para melhor caracterizar as substâncias radioprotetoras.

CAPITULO II

EFEITO DO EXTRATO DA PRÓPOLIS DE *TETRAGONA CLAVIPES* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MDA-MB-231 IRRADIADAS COM COBALTO-60

RESUMO

O câncer de mama tem aumentado entre as mulheres, principalmente entre a faixa etária de 40 a 59 anos, fatores genéticos, ambientais e comportamentais, têm sido atribuídos ao crescimento desta moléstia. Embora as terapias anticancerígenas, que utilizam radiação ionizante apresentem melhores resultados, esse tratamento está sujeito a mecanismos envolvidos na resistência ao câncer. Sendo assim, é importante a associação de novos agentes ao tratamento radioterápico que aumentem a sobrevida de pacientes com câncer de mama e diminuam a toxicidade do tratamento. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do extrato da própolis sobre a viabilidade celular de células tumorais da linhagem de adenocarcinoma de MDA-MB-231. Grupos controle (GC), controle irradiado (GCI), irradiado exposto ao extrato de própolis de (GIE), em triplicata, foram estabelecidos. As células foram irradiadas com baixa LET (Linear Energy Transfer) com cinética de doses pré-determinada de 2 e 5Gy e tratadas com extrato de própolis nas concentrações de 1% e 10%. As coletas pós-irradiação foram realizadas nos tempos pré-estabelecidos de 24, 48 e 72 h. Foi aplicado o Teste de viabilidade pela técnica do MTT. Este estudo mostrou que em cinética de doses de irradiação ocorreu uma diminuição da viabilidade celular, esse efeito foi potencializado quando a cultura foi exposta ao extrato da própolis, principalmente na concentração de 10% do extrato em cultura, associado à radiação de 5Gy. Esta investigação abre uma perspectiva relevante acerca do papel da própolis como um adjuvante ao padrão radioterápico de pacientes submetidos ao tratamento de câncer de mama.

Palavras chaves: Própolis, MDA-MB-231, radiação, câncer, mama

ABSTRACT

Breast cancer has increased among women, especially among the age group of 40 to 59 years, genetic, environmental and behavioral factors, have been attributed to the growth of this disease. Although anticancer therapies using ionizing radiation show better results, such treatment is subject to mechanisms involved in cancer resistance. Thus, it is important to associate new agents to the radiotherapy treatment that increase the survival of patients with breast cancer and decrease the toxicity of the treatment. Thus, the present study aimed to evaluate the *in vitro* effect of the propolis extract on the cell viability of cancer cells of the MDA-MB-231 lineage. Control groups (GC), irradiated control (GCI), irradiated exposed to the propolis extract of (GIE), in triplicate, were established. Cells were irradiated with low LET (Linear Energy Transfer) with pre-determined dose kinetics of 2 and 5Gy and treated with propolis extract at concentrations of 1% and 10%. Post-irradiation collections were performed at the pre-established times of 24, 48 and 72 h. The Feasibility Test was applied by the MTT technique. This study showed that in irradiation dose kinetics there was a decrease in cell viability, this effect was potentiated when the culture was exposed to the propolis extract, mainly in the concentration of 10% of the extract in culture, associated with radiation of 5 Gy. This research opens a relevant perspective on the role of propolis as an adjuvant to the radiotherapy standard of patients undergoing breast cancer treatment.

Keywords: Propolis, MDA-MB-231, radiation, breast cancer

1 – INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um carcinoma inflamatório mais raro e normalmente se apresenta de forma agressiva, comprometendo toda a mama, deixando-a edemaciada e hiperemiada (LISBOA, 2009; GODINHO & KOCH, 2004). O sintoma inicial do câncer é um pequeno nódulo no seio, geralmente indolor e que pode crescer lenta ou rapidamente dependendo de sua carcinogênese (BRITO *et al.*, 2007).

Neste sentido, o câncer de mama é uma das doenças mais incidentes em mulheres na faixa etária de 40 a 59 anos com múltiplos fatores de risco associados: fatores genéticos, ambientais e comportamentais, caracterizando-se pela proliferação desordenada e em constante crescimento das células deste órgão (BRITO *et al.*, 2007; HADDAD, 2010).

Apesar da comprovada eficácia dos tratamentos utilizados atualmente, casos de intolerância e insucesso são recorrentes. Isso porque a grande dificuldade no tratamento do câncer é o fato de suas células doentes se adaptarem e sobreviverem a terapias, levando à resistência (MARIA, 2013).

Dentre os tratamentos para o câncer, encontra-se a terapia que utiliza radiação ionizante. A radioterapia é o procedimento mais comum utilizado no tratamento do câncer humano (EBEID *et al.*, 2016). A terapia de radiação destrói as células na área exposta danificando o seu material genético (SANKARANARAYANAN, 2006). A radiação ionizante não faz distinção entre células normais e malignas, dessa forma, os pacientes podem apresentar sintomas durante o tratamento ou após semanas, meses ou anos mais tarde (KARBOWNIK; REITER, 2000).

Os pacientes com câncer de mama, em particular, costumam fazer uso de remédios alternativos e naturais para seu câncer mais do que pacientes com outras malignidades

(DIGIANNI *et al.*, 2002). Cerca de 63-83% dos pacientes com câncer de mama usam pelo menos um tipo de medicina alternativa e 25-63% tomam remédios de ervas e vitaminas (CROCETTI *et al.*, 1998; MORRIS *et al.*, 2000).

A própolis é uma formulação naturopática coletada por abelhas de gemas e exsudados de coníferas árvores e plantas (WU *et al.*, 2011). O conhecimento de suas propriedades radioprotetoras tem aumentado ao longo da última década, e seus efeitos têm sido extensivamente estudados *in vitro* e *in vivo* (BENKOVIC *et al.*, 2009).

Os principais constituintes da própolis são os flavonóides, ácidos orgânicos, fenóis, vários tipos de enzimas, vitaminas e minerais. (BANKOVA, 2005). Os flavonóides, substâncias ativas na própolis mostraram ação antibacteriana, analgésico / anti-inflamatório, anti-oxidante, melhorou a resposta imune, a atividade anti-proliferativa em células de tumor humano em cultura e a atividade anti-tumor em ratinhos. A atividade antioxidante dos flavonóides é baseada na capacidade de radicais livres diretos que limpam ou estabilizar as espécies de oxigênio reativas (ROS) através da interação com o composto reativo de radical (BENKOVIC *et al.*, 2008ab).

A resistência a todos os tipos de tratamento sistêmico (hormonais, quimioterápicos e agentes direcionados) é estimada para tornar os tumores sólidos letais em mais de 90% dos pacientes com doença metastática. Portanto, existe uma grande necessidade de novos agentes que aumentariam a sobrevida de pacientes com câncer de mama avançado e diminuindo a toxicidade do tratamento (WU *et al.*, 2011).

Sendo assim, foi proposto nesse trabalho investigar a influência do extrato da própolis de *Tetragona clavipes* sobre a viabilidade celular de linhagem de adenocarcima de mama (MDA-MB-231) radioresistente, irradiadas com doses de radiação ionizante pré-estabelecidas.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS

A própolis bruta foi obtida da Fazenda Poranga localizada no Município de Itacoatiara Estado do Amazonas – Brasil, proveniente da colméia da abelha de espécie *Tetragona clavipes*. A amostra de própolis foi mantida sob refrigeração a 4 °C e, posteriormente foi preparado o extrato da própolis, conforme descrito por (Matsushige *et al.*, 1996) com algumas modificações. Em um Becker foi adicionado 500 ml de água desionizada e 100 gramas de própolis bruta triturada em liquidificador. Foi aguardado por 24 horas. Foi aquecida a mistura em banho termostatizado com água a 80°C, por duas horas. Posteriormente essa solução foi turbolizada em liquidificador, filtrada (filtro de gaze), acoplado a funil e kitassato. O filtrado foi seco em banho Maria durante 48 horas. Finalmente, foi ressuspenso o pó resultante em meio RPMI nas concentrações desejadas.

2.2 - LINHAGEM PRÉ-ESTABELECIDAS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Foram empregadas células da linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231. As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos gentamicina (50 µg.µL⁻¹) e estreptomicina (500 mg.mL⁻¹), em frascos de cultura T-25 em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. A MDAMB-231 confluiu de forma aderente no frasco de cultura. Toda manipulação das células foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (Biological Cabinet BBL modelo 60474).

2.3- CONTROLE

O controle foi feito com culturas de e MDA-MB-231 com e sem exposição à irradiação e que não receberam o extrato aquoso de própolis, mantidas em cultura como descrito.

2.4 - TRATAMENTO DAS CULTURAS COM PRÓPOLIS

As concentrações do extrato aquoso de própolis utilizada foram de 1% e 10%, da qual foram plaqueados 100 µL diretamente nas culturas de e MDA-MB-231 irradiadas e não irradiadas, cultivadas em triplicata.

2.5- RADIAÇÃO E CINÉTICA DE DOSE

As garrafas T-25 contendo as células foram vedadas com parafilme e transportadas dentro de um frasco plástico rígido tampado, previamente descontaminado com álcool a 70%, até o local de irradiação. Uma placa de 4 cm de material tecido equivalente foi colocada abaixo do frasco T-25, bem como o meio de cultura foi preenchido até 5 mm de altura, em relação à superfície das células aderidas. Este procedimento foi necessário para alcançar o equilíbrio eletrônico e garantir as doses prescritas nas células aderentes. Frascos T-25 de cultura confluenta foram submetidos à irradiação com Co-60, no Laboratório de Irradiação Gama – LIG do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN. Após a exposição, as células retornaram à incubadora de CO₂. Foram utilizadas doses de 2 e 5 Gy para células da linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

2.6 - CINÉTICA NO TEMPO

Os frascos de culturas *in vitro* que foram submetidos às doses e taxas de dose supracitadas retornaram para estufa de CO₂ a 37°C após a irradiação. Alíquotas de células

irradiadas e não irradiadas (controle) foram coletadas em tempos pré-estabelecidos, em 24, 48 e 72 horas pós-irradiação, respectivamente.

2.7- AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE

Das triplicatas de alíquotas dos distintos tempos de irradiação, foram plaqueados 100 μL de amostra em cada poço, em placas de ELISA – fundo plano (12×8) – e mantidas em incubação por 24 horas. Foram adicionados 20 μL (5mg.mL^{-1}) de MTT em cada poço e as amostras retornaram para a incubadora onde permaneceram metabolizando o MTT por 4 horas. Após a metabolização, 80 μL foram descartados de cada poço e foram adicionados 80 μL de isopropanol (0,04 M). As placas foram incubadas por mais 18 horas. A viabilidade celular foi mensurada pela medida da densidade óptica (DO) utilizando a leitora de análise de imunoabsorção por ligação enzimática (enzymelinkedimmunosorbentassay – ELISA) no comprimento de onda de 595 nm em aparelho de ELISA Elx800. A primeira fileira corresponde ao branco da leitora de ELISA. O teste de viabilidade celular pelo MTT teve como princípio a verificação da viabilidade e quantificação da proliferação celular baseada na clivagem do sal tetrazólio (MTT). Após a incubação das células submetidas a esse ensaio, formou-se uma solução corante, que é medida por meio da leitora de ELISA, e dessa forma foi possível correlacionar a absorbância com o número de células.

2.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias de densidade óptica obtidas através do teste de MTT em células MDA-MB-231, foram submetidas à análise de variância, tendo as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de significância. Neste contexto, foram utilizadas letras para diferenciar as comparações, neste caso, as letras minúsculas nas colunas representam a decomposição da interação dos tratamentos dentro de cada tempo (24, 48 e 72) nas células não irradiadas e irradiadas de acordo com duas doses (2 e 5 Gy). As letras maiúsculas, por sua vez,

representam a decomposição da interação dos tempos (24, 48 e 72) dentro de cada tratamento nas células não irradiadas e irradiadas de acordo com duas doses (2 e 5 Gy).

3 – RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o efeito do extrato aquoso da própolis sobre a viabilidade das células provenientes de linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, que foram tratadas com extrato da própolis, nas concentrações de 1% e 10%. Os resultados do experimento controle demonstraram a capacidade de clonogênese da linhagem de células MDA-MB-231, mostrando confluência nos frascos de cultura T-25 (Figura 1). As células foram repicadas a cada 24 horas, com a respectiva troca do meio DMEM, suplementado com antibiótico-antimicótico, evitando a saturação do mesmo.

Ao considerar a decomposição do tratamento dentro de cada tempo não houve diferença entre os tempos quando utilizou concentração a 1%. Esse comportamento foi observado também na concentração a 10%. Em relação à decomposição do tempo dentro de cada tratamento, houve diferença significativa no tempo de 72 horas em todas as concentrações e, menor resultado de viabilidade na concentração a 10%. Então, quanto maior a concentração de extrato que as células são submetidas menor é a sua viabilidade. Sendo assim, a própolis potencializa o efeito da radiação ionizante sobre as células MDA-MB-231 levando-as a apoptose.

Resultados de Viabilidade de células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 após exposição ao extrato de própolis

Tratamento	Viabilidade celular (DO - nm)			Médias dos tratamentos x tempos
	24	48	72	
Controle	4,16aB	4,83aAB	5,20aA	4,73
Extrato 1%	4,30aA	4,60aA	4,10bA	4,33
Extrato 10%	3,41bA	3,73bA	3,06cA	3,33
Médias dos tempos x tratamentos	3,95	4,39	4,12	

DMS tempos x tratamentos	DMS tratamento x tempos
0,6304	0,6304

Tabela 1- Perfis de viabilidade em densidade óptica na cinética de tempos de 24, 48 e 72 horas, determinados pelo teste de MTT em cultura *in vitro* de MDA-MB-231 antes (controle) e após a exposição às concentrações de 1% e 10% de própolis. Letras maiúsculas iguais nas linhas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tempos dentro de cada tratamento (controle e os extrato de própolis). Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tratamentos dentro de cada tempo (24,48 e 72 horas). DMS – Diferença mínima significativa.

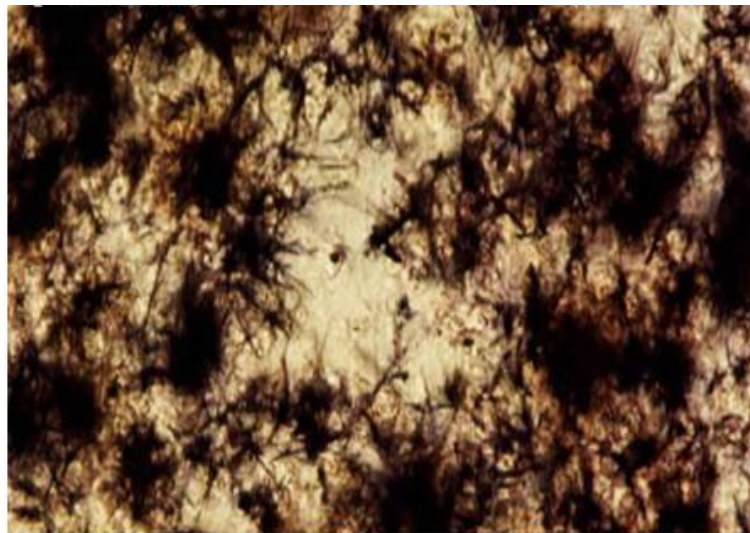


Figura 1 - Campos ópticos arbitrários em microscopia inversa (800 X) das células de adenocarcinoma de mama MDA MB-231 em cultura, em cinética de tempo para o teste de MTT.

A Tabela 2 mostra o perfil de viabilidade celular pelo teste de MTT para cultura de MDA-MB-231 *in vitro* de suspensão homogeneizada de células de (T-25) que foram irradiadas com 2Gy, e receberam extrato de própolis a concentração de 1% e 10%.

Os resultados da decomposição do tempo dentro de cada tratamento revelam que no tempo de 24 horas as células MDA-MB-231 que não receberam extrato de própolis, mas foram expostas a radiação, cresceram.

Por outro lado o resultado da decomposição do tratamento dentro de cada tempo nas duas concentrações utilizadas a 1% e 10% as células apresentaram diminuição em seu nível de sobrevivência apenas nas 72 horas, então aqui nesse experimento a concentração de extrato

não influencia a morte das células, mas o tempo apresentou efeito sobre o nível de sobrevivência, dessa forma, quanto mais tempo essas células ficaram expostas ao extrato menor foi seu nível de sobrevivência (Tabela 2).

Resultados de viabilidade de células de adenocarcinoma de mama MDA-MB- 231 irradiadas com dose de 2Gy, após exposição ao extrato de própolis nas concentrações de 1% e 10%

Tratamento	Viabilidade celular (do - nm)			Médias dos tempo x tratamentos
	24	48	72	
Controle	3.43ab	3.86aab	4.20 aa	3.83
Extrato 1%	2.63bb	2.90ba b	3.33ba	2.95
Extrato 10%	2.33bb	3.26aba	3.93aba	2.84
Médias dos tempos x tratamento	2.79	3.34	3.82	
DMS tempos x tratamento				DMS tempo x tratamentos
0,67167				0,7421

Tabela 2 - Perfis de sobrevivência em cinética nos tempos de 24, 48 e 72 horas, determinados pelo teste de MTT em cultura *in vitro* de MDA-MB-231 antes (controle) e após a exposição às concentrações de 1% e 10% de extrato aquoso de própolis e irradiação na dose de 2Gy. Letras maiúsculas iguais nas linhas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tempos dentro de cada tratamento (controle e os extrato de própolis). Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tratamentos dentro de cada tempo (24,48 e 72 horas).

A Tabela 3 mostra através dos valores médios de viabilidade pelo teste de MTT para cultura de MDA-MB-231 *in vitro* que a radiação representa um efeito citotóxico sobre as culturas de células de adenocarcinoma mamário. Dessa forma, os resultados apresentaram uma diminuição significativa na densidade ótica (DO) na dose de 5 Gy em relação ao tempo de 72h.

Em relação à decomposição do tratamento dentro de cada tempo, houve diferença entre 24 horas e 72 horas, mas não houve diferença quando comparada as 48 horas. No tratamento a 10% dentro tempo de 24 horas apresentou diferença significativa comparando 48 e 72 horas. Já entre 72 horas não há diferença significativa (Tabela 3).

Considerando o tempo dentro de cada tempo em 48 horas houve diferença entre a concentração a 10% a 1%. Em relação a 72 horas o controle se difere dos demais tratamentos. Porém a 1% e 10% não há diferença significativa nesse tempo, ou seja, não há interferência entre as concentrações se for usada uma concentração menor ou maior, (Tabela 3).

Resultados de viabilidade de células de adenocarcinoma de mama MDA-MB- 231 irradiadas com dose de 5Gy, após exposição ao extrato de própolis nas concentrações de 1% e 10%

Tratamento	Viabilidade celular (DO - nm)			Médias dos tempos x tratamentos
	24	48	72	
Controle	3,33aB	3,26aAB	3,93 aA	3,17
Extrato 1%	1,96aB	3,10abA	2,70bAB	2,59
Extrato 10%	1,40aB	2,23bA	2,33bA	1,99
Médias dos tempos x tratamentos	1,90	2,86	2,98	
DMS tempos x tratamentos				DMS tempos x tratamentos
0,6304				0,6304

Tabela 3- Perfis de viabilidade em densidade óptica cinética nos tempos de 24, 48 e 72 horas, determinados pelo teste de MTT em cultura in vitro de MDA-MB-231 antes (controle) e após a exposição às concentrações de 1% e 10% de extrato aquoso de própolis e irradiação na dose de 5Gy. Letras maiúsculas iguais nas linhas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tempos dentro de cada tratamento (controle e os extrato de própolis). Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferenças ($P > 0,05$ - pelo teste de Tukey) na comparação dos tratamentos dentro de cada tempo (24,48 e 72 horas). DMS – diferença mínima significativa.

4- DISCUSSÃO

A proposta deste estudo foi investigar a influência da própolis brasileira, particularmente própolis procedente de Itacoatiara – Amazonas sobre os danos citotóxicos, bem como sobre o potencial anti proliferativo de células da linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, irradiadas com ^{60}Co .

As células MDA-MB-231 pertencem a uma linhagem de câncer de mama humano bastante tumorigênico e metastático (FURTADO *et al.*, 2012). Essas linhagens de células de adenocarcinoma são radio resistentes, ou seja, a medida que as células recebem maior dose de radiação o índice de sobrevivência diminui (FALCÃO *et al.*, 2015).

Os dados obtidos através do teste de citotoxicidade pelo MTT mostraram que o tratamento de culturas *in vitro* com as células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 e o extrato da própolis na concentração mais alta utilizada (10%) (Tabela 1) foi capaz de induzir a diminuição da viabilidade celular, provavelmente pelo dano da função enzimática de cofatores envolvidos na transcrição gênica dessas células (FALCÃO *et al.*, 2015).

Correlacionando os dados entre o grupo controle e as células de linhagem de adenocarcinoma MDA-MB-231 que receberam o extrato da própolis observou-se que a própolis apresentou um papel importante sobre a viabilidade celular em células tumorais, ou seja, apresenta um efeito deletério sobre células de câncer de mama. Considerando uma baixa dose de concentração do extrato da própolis (1%) os resultados não apontam para uma diminuição da viabilidade celular após a adição do extrato em relação ao controle não tratado. No entanto, obteve-se uma diminuição significativa da viabilidade celular quando as células foram expostas a concentração de 10%.

Com relação à dose de radiação de 5Gy obteve-se morte tumoral, ocorrendo diminuição da viabilidade celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, porém quando adicionou-se à própolis o nível de proliferação celular foi reduzido. Neste contexto, sugere-se que o extrato da própolis potencializa o efeito deletério da radiação sobre as células tumorais. Essa ação anti proliferativa da própolis foi observada em outras linhagens tumorais, tais como carcinoma do cólon humano (CaCo₂, HCT116, HT29, SW480), carcinoma de colo murino (26-L5), melanoma de murino (B16-BL6), fibrosarcoma humano (HT1080), adenocarcinoma humano de pulmão (A549) e carcinoma de próstata (DU145) (ISHIHARA *et al*, 2009; LI *et al*, 2009; RUSSO *et al*, 2004).

Em estudos Ishihara *et al*. (2009) constataram que a expressão dos genes p21 e p53 são responsáveis, pelo menos em parte, na indução de apoptose e consequentemente, na inibição do crescimento de várias linhagens celulares do carcinoma de cólon humano, mediada pelo extrato da própolis. Os autores demonstraram ainda que tanto as linhagens celulares com p53 selvagem (HCT116) como aquelas mutantes de p53 (HT29 e SW480) foram igualmente sensíveis à inibição do crescimento induzida pelo extrato de própolis. Estes resultados permitiram aos autores sugerirem o envolvimento de rotas dependente e independente de p53 para indução de apoptose, também em células p53 mutante, o que pode incluir também células MDA do presente estudo.

A morte reprodutiva foi investigada por Santos (2011), como uma outra modalidade de morte celular, pelo teste foi constatado a formação de colônias, na obtenção de curva de sobrevivida. Esse processo de perda da habilidade em formar colônias é um evento crítico em radioterapia do tumor, desse modo, o problema clínico de recorrência do tumor envolve algumas células que não somente sobrevivem durante o tratamento radioterápico, mas retém a habilidade de proliferar e repopular o tumor, propagando a malignidade (SCOTT *et al*., 2003).

Neste contexto, as observações realizadas neste estudo corroboram com os dados descritos em outros trabalhos, em que é mostrado um amplo espectro de propriedades anti proliferativas de extrato de própolis para várias linhagens de células de carcinoma. Entretanto, os mecanismos exatos da atividade anticarcinogênica permanecem pouco compreendidos. Há constatação de que essa atividade inibidora da própolis no crescimento de células tumorais, está intimamente associada ao CAPE, composto majoritário presente na própolis, que inibiu o crescimento do câncer de mama humano MDA-231 e MCF-7 através de efeitos apoptóticos, atuando na modulação de NF- κ B, no ciclo celular e na angiogênese (WU *et al.*, 2011).

Sendo assim, o tratamento associado da própolis nas concentrações de 1% e 10% à radiação nas doses de 2 e 5Gy em células de MDA-MB-231 exibiu um efeito anti proliferativo. Esses resultados sugeriram que o extrato da própolis parece inibir a expansão clonal nessas doses de concentração, principalmente após 72h em cultura e que possivelmente os co-fatores ou enzimas produzidas foram capazes de induzir a viabilidade de células “naive”.

5 – CONCLUSÃO

Concluiu-se que houve diminuição na viabilidade de células de adenocarcinoma de mama MD-MB-231, ou seja, a associação de própolis com tratamento de radioterapia potencializou os danos causados por radiação ionizante, estimulando apoptose dessas células.

Dessa forma, podemos inferir que a própolis é um agente que atenua o efeito da radiação ionizante sobre células de câncer de mama. Logo, esse estudo abre uma perspectiva relevante acerca do papel da própolis, sendo um candidato viável como um novo agente terapêutico, bem como um adjuvante ao padrão radioterápico de pacientes submetidos ao tratamento de câncer de mama. Estudos sobre os constituintes responsáveis por esse papel radioindutor de apoptose da própolis são necessários para confirmar nossos achados.

CAPITULO III

PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS DE *TETRAGONA CLAVIPES*

RESUMO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A procura por alívio e cura de doenças pelo uso de plantas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A própolis proveniente das abelhas apresenta grande aceitação devido às suas propriedades terapêuticas, por isso que nos últimos anos tem-se verificado um crescente interesse pela medicina popular desse produto das abelhas para o controle de enfermidades. Quimicamente, a própolis apresenta diversos compostos, vários estudos comprovam que estas substâncias bioativas são responsáveis por sua atividade terapêutica, uma vez que existe uma diversidade muito grande de componentes presentes na própolis. Considerando a importância da própolis apresentar em sua composição componentes químicos com propriedades biológicas fundamentais para o tratamento de doenças graves, e a escassez de descrição na literatura sobre a composição química da própolis da espécie de abelha *Tetragona clavipes*, o presente trabalho teve como objetivo detectar principais classes de substâncias do grupo fenilpropanóides (Flavonóides e Taninos); Terpenóides (esteróides e triterpenóides) e Glicosídeos (Saponinas). O extrato foi preparado a partir do triturado da amostra bruta de própolis proveniente do Município de Itacoatiara - AM. Os perfis químicos preliminares dos extratos foram analisados através de ensaios cromáticos em tubos, para detecção de fenólicos, terpenóides e saponinas. A prospecção química do extrato indicou a presença taninos condensados, catequinas (tanino catéquicos), flavonas, triterpenóides pentacíclicos e teste positivo para saponinas. O estudo aqui detalhado tem sua importância na primazia da abordagem química em amostra de própolis da espécie de abelha *Tetragona clavipes* do município de Itacoatiara-AM. Os resultados apresentados serão a base para estudos futuros.

Palavras chaves: Extrato, própolis, fenólicos, compostos.

ABSTRAT

Natural products have been used by mankind since time immemorial. The search for relief and cure of diseases by ingestion of herbs and leaves may have been one of the first ways of using natural products. Propolis from bees is widely accepted because of its therapeutic properties, which is why in recent years there has been a growing interest in the popular medicine of this bee product for the control of diseases. Chemically, propolis has several compounds, several studies prove that these bioactive substances are responsible for its therapeutic activity, since there is a very large diversity of components present in propolis. Considering the importance of propolis in its composition as chemical components with fundamental biological properties for the treatment of serious diseases, and the lack of description in the literature on the chemical composition of the propolis of the bee species *Tetragonaclavipe*, the present work had as objective to determine the Presence of natural compounds of the phenylpropanoid group (Flavonoids and Tannins); Terpenoids (steroids and triterpenoids) and Glycosides (Saponins). The extract was prepared from the crushing of the crude propolis sample from the Minicipio de Itacoatiara-AM. The preliminary chemical profiles of the extracts were analyzed through chromatic tube tests for the detection of phenolics, terpenoids and saponins. The chemical prospection of the extract indicated the presence of condensed tannins, catechins (tannin catheters), flavones, pentacyclicTriterpenoids and a positive test for saponins. The study detailed here has its importance in the primacy of the chemical approach in a sample of propolis of the bee species *Tetragonaclavipes* of the municipality of Itacoatiara-AM. The results presented will be the basis for future studies.

Key words: Extract, propolis, phenolics, compounds.

1 - INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura resinosa complexa que contém bálsamo e cera coletada pelas abelhas de diversas partes da planta, como do broto, botões florais e exsudatos resinosos, misturada às enzimas presentes na saliva produzidas pelo seu organismo. A mistura apresenta um aspecto variado em relação à coloração e consistência cuja utilização pode ser observada desde a vedação de pequenas frestas até a embalsamação de insetos mortos no interior da colméia e proteção contra agentes externos (MATOS, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2016).

Considerando os produtos da abelha, a própolis tem sido utilizada a milhares de anos e vem se destacando tanto por suas propriedades terapêuticas como antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, cicatrizante, anticariogênica e anestésica, quanto pela possibilidade de aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica (PARK *et al.*, 1998a,b; KOO *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2000; DOS SANTOS *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2006; LONGHINI *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado os benefícios dos antioxidantes para a saúde, devido aos efeitos sobre a prevenção de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento. Os compostos fenólicos são substâncias antioxidantes frequentemente encontradas na própolis (ARAÚJO *et al.*, 2016).

A própolis contém uma variedade de compostos químicos, já caracterizados, tais como polifenóis (flavonóides e ácidos fenólicos e os seus ésteres), terpenóides, esteróides, e dos ácidos aminados, os aldeídos voláteis e cetonas (CHAILLOU & NAZARENO, 2009; KALOGEROPOULOS *et al.*, 2009; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008). Vários autores têm relatado que alguns compostos presentes em extratos de própolis poderiam apresentar atividade antioxidante antibacteriana (BASIM *et al.*, 2006, SILVA *et al.*, 2006; UZEL *et al.*, 2005).

O Artepilin C (ácido 3,5 - diprenil-4- hidroxicinâmico) é o principal componente fenólico biologicamente ativo encontrado na própolis. Esse composto exerce ação antiproliferativa direta, citotóxica e apoptótica, apresentando efeitos sobre as células cancerígenas gástricas, do cólon e pulmão, inibe tumores sólidos em humanos e ratos (KIMOTO *et al.*,1998).

As investigações sobre a composição química da própolis brasileira têm demonstrado que existe uma variabilidade elevada em relação à composição, tanto qualitativa como quantitativa dos compostos fenólicos (SILVA *et al.*, 2013). A constituição química da própolis é influenciada pela flora local e pelas características geográficas e climáticas do ambiente (SILVA *et al.*, 2013; MUNIZ *et al.*, 2009).

Sendo assim, como ainda não foi descrito nenhum estudo sobre a caracterização química da própolis produzida pela abelha da espécie *Tetragona clavipes* proveniente do município de Itacoatiara- AM torna-se relevante a realização da prospecção química deste referido produto, que irá contribuir para a caracterização biomolecular futuras de frações específicas que atuam sobre os sistemas biológicos sob investigação em estudo *in vitro*. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença ou não de classes substâncias do grupo fenilpropanóides (Flavonóides e Taninos); Terpenóides (esteróides e triterpenóides) e Glicosídeos (Saponinas).

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Coleta das amostras de própolis

A própolis bruta foi obtida da Fazenda Poranga localizada no Município de Itacoatiara Estado do Amazonas – Brasil, proveniente da colméia da abelha de espécie *Tetragonaclavipes* (Borá). A amostra de própolis foi levada ao laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas e mantida sob refrigeração a 4 °C.

2.2 - Preparação e abordagem química do extrato aquoso de própolis (EAP)

A amostra de própolis bruta (100g) foi triturada em turbolizador (liquidificador) juntamente com 500mL de água deionizada, esse extrato ficou armazenado por 24 horas. A mistura foi aquecida em banho termostático com água a 80 °C, por duas horas. Posteriormente essa solução foi turbolizada em liquidificador, filtrada, acoplado a funil e kitassato. O filtrado foi seco em banho Maria durante 48 h (Matsushige *et al*, 1996).

O extrato aquoso da própolis (EAP) foi submetido à abordagem química para análise dos seguintes grupos: compostos fenólicos, flavonoides, terpenos e saponinas (Matos, 1999).

2.3 - Preparação da solução-estoque e prospecções química

O extrato seco EAP foi analisado através de ensaios cromáticos usuais em tubos de ensaio, utilizando-se os reagentes convencionais para detecção de grupos fenólicos específicos. Para o preparo da solução-estoque pesou-se cerca de 300mg de extrato bruto em béquer. Em seguida procedeu-se a extração com metanol a 70%, transferiu-se todo o conteúdo do extrato para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado.

Uma alíquota de cada solução foi acidificada até pH 4 com uma solução de ácidoclorídrico 0,1 M. Seguiu-se com a filtração dessa solução e transferência de 3 mL paratubos de ensaio. Todos os ensaios desta análise foram realizados a partir da solução estoque em triplicata. Os resultados foram baseados na mudança de coloração após reação, quando comparados com os brancos positivo (T0 - somente solução estoque) e negativo (reagente mais água destilada).

2.4 - Teste para determinação de fenóis e taninos

Em um tubo de ensaio (T1) foi adicionado 3mL da solução-estoque. A este tubo foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 . As alterações após reação foram observadas, comparando-se com os brancos. O desenvolvimento da cor azul-avermelhado indica a presença de fenóis. Precipitado azul indica taninos hidrolisáveis e precipitado verde taninos condensados (MATOS, 2009).

2.5 - Teste para determinação de antocianidinas, antocianinas e outros flavonoides

Foram adicionados 3mL da solução-estoque em três tubos de ensaio. No primeiro tubo (T2) a solução foi ajustada até pH 3 com HCl a 0,5N no segundo (T3) ajustou-se o pH em 8,5 e no terceiro (T4) até pH 11, ambos com NaOH a 0,5N. Após alguns minutos, a coloração foi observada e comparada com o branco. Neste ensaio em pH 3 a reação de cor vermelha sugere presença de chalconas, auronas, antocianinas e antocianidinas. A ausência de coloração lilás em pH 8,5 e azul-púrpura em pH 11 sugere a ausência de antocianinas e antocianidinas (MATOS, 2009).

2.6 - Teste para determinação de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Foram adicionados 3mL da solução-estoque em dois tubos de ensaio, o primeiro(T5) foi acidificado até pH 3 com HCl a 0,5N e o segundo (T6) foi alcalinizado até pH 11 com NaOH a 0,5N. Os tubos foram submetidos a aquecimento em bico de Bunsen porcerca de 2 minutos, e, após observou-se a coloração em comparação ao branco (T0).

Nesse teste, em pH 3, as leucoantocianidinas apresentam coloração vermelha, e ascatequinas cor pardo-amarelado. Em pH 11 as flavanonas coram-se em vermelho laranja (MATOS, 2009).

2.7- Teste para determinação de esteroides e triterpenoides (LIEBERMAN – BURCHARD)

Pesou-se cerca de 0,200 mg de extrato seco em um bécker adicionou-se 2mL de clorofórmio, repetiu-se esse processo por três vezes, tendo o cuidado de triturar bem o resíduo com o solvente. Filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão e coberta com alguns decigramas de Na₂SO₄ anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1mL de anidrido acético, agitou-se suavemente e juntou-se cuidadosamente três gotas de H₂SO₄ concentrado. Tornou-se agitar suavemente e observou-se rápido desenvolvimento de cores. Neste ensaio a coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroide livres. A presença de coloração parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres (MATOS, 2009).

2.8 - Teste para determinação de saponinas

Tomou-se o resíduo insolúvel, retido no funil, separado na operação anterior, redissolveu-se com 10 mL de água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com solução, fortemente; por dois minutos. Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponina heterósídeos saponínicos (MATOS, 2009).

2.9 - Teste confirmatório para saponinas

Adicionou-se 2mL de HCl concentrado ao conteúdo do tubo preparado no teste anterior e deixou-o durante uma hora imerso em banho-maria. Deixou-se esfriar, neutralizou-se com hidróxido de amônio e agitou-se novamente. A presença de precipitado e a não formação de espuma quando agitado novamente confirma a presença de saponinas.

3 – RESULTADOS

3.1- Teste para determinação de fenóis e taninos

O teste realizado para determinação de fenóis e taninos após a adição de FeCl_3 apresentou coloração esverdeada quando comparada ao branco contendo apenas FeCl_3 demonstrado na Figura 1. De acordo com Matos (2009) essa coloração diz respeito à presença de taninos condensados.

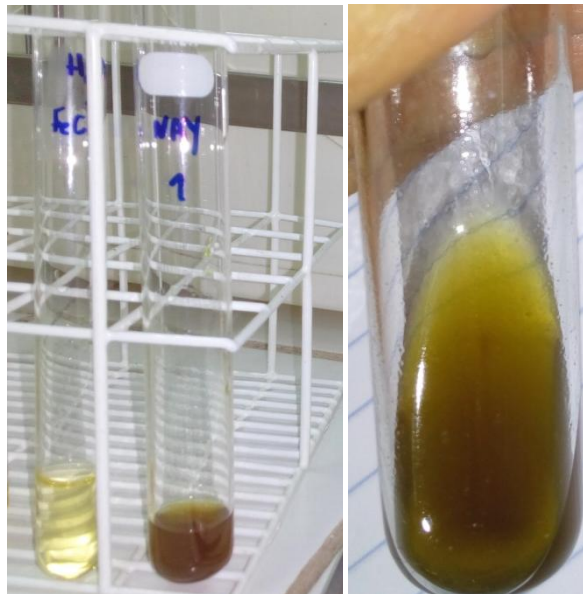


Figura 1- Resultado para o teste de fenóis e taninos – presença de taninos condensados com a verificação de intensidade de cor

3.2- Teste para determinação de antocianidinas, antocianinas e flavonoides

O tubo (2) contendo a amostra em que o pH foi ajustado para 3 não apresentou coloração vermelha sugestiva para a presença de chalconas, auronas, antocianinas e antocianidinas. No tubo (3) não houve formação de coloração lilás em pH 8,5 presença de antocianinas e antocianidinas, o tubo (4) por sua vez não apresentou a cor azul-púrpura, vermelho púrpura em pH 11 a não formação de coloração corroborou para a ausência de antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas. Em pH 11 a cor da solução apresentou

variação entre as cor laranja e a amarela intenso representando a presença de flavona, flavonóis e xantonas Matos (2009).

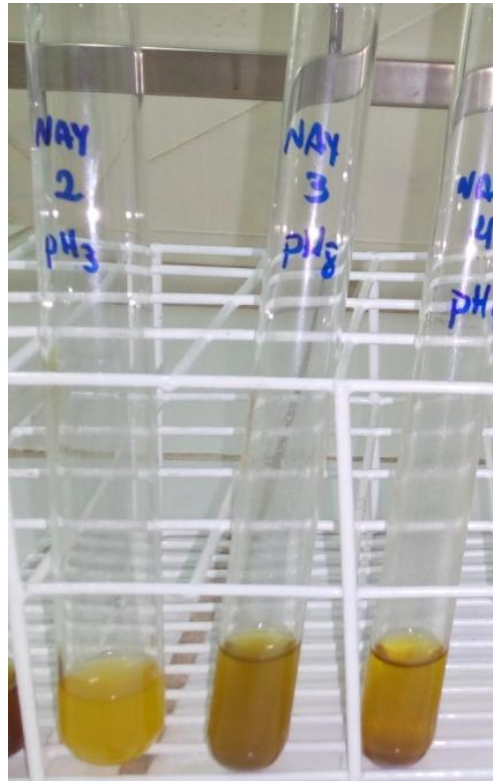


Figura 2- Resultado para determinação de antocianidinas, antocianinas e flavonoides - presença de flavona, flavonóis e xantona

3.3-Teste para determinação de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

A Figura 3 a apresenta os resultados de cores observadas nas análises para a presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas. Não houve formação de coloração vermelha indicando que não há leucoantocianidinas na amostra analisada em meio acidificado, porém foi possível observar após aquecimento o aparecimento da coloração amarelo pardo indicando a presença de catequinas (taninos catéquicos) (MATOS,2009). No tubo (6) em pH alcalino o resultado demonstrou presença de flavonas devido a formação de coloração vermelho laranja Matos (2009).

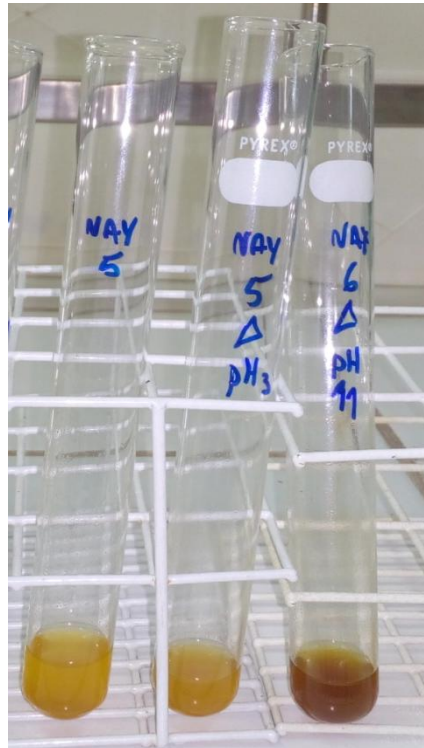


Figura 3- Resultado para o teste de determinação leucoantocianidinas, catequinas e flavonas - coloração vermelho laranja - presença de flavonas.

3.4 - Teste para determinação de esteroides e triterpenoides (LIEBERMAN – BURCHARD)

O resultado obtido para determinação de esteroide e triterpenoides pelo teste de Lieberman Burchard, não apresentou a coloração azul evanescente seguida de verde permanente que é indicativa da presença de esteroides livres, porém apresentou a coloração avermelhada (Figura 4) indicando a presença de triterpenoides pentacíclicos na análise em tubo realizada (MATOS, 2009).



Figura 4- Resultado para determinação de esteróides e triterpenoides (Lieberman – Burchard)– presença decoloração avermelhada indicando triterpenoides pentacíclicos

3.5 - Teste para determinação de saponinas

No teste de formação de espuma para a detecção da presença de saponinas, foi obtido uma espuma abundante persistente mesmo com adição de ácido clorídrico, o que demonstra a resistência da espuma a adição de ácido, indicando um resultado positivo para presença e identificação de saponinas.



Figura 5- Resultado para o teste de determinação de saponinas – Formação de espuma, após aquecimento formação de precipitado.

4 – DISCUSSÃO

Atualmente a própolis é considerada um dos produtos naturais de maior destaque, conhecida pelas diversas propriedades biológicas que possui e assim utilizada como antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatório, imunomodulador, hipotensor, cicatrizante, anestésico, anticancerígeno e anti-HIV (BARBOSA *et al.*, 2009). Diante disso, a ação terapêutica da própolis pode ser relacionada com sua composição química, que apresenta, até o momento, cerca de aproximadamente 200 elementos já identificados, sendo os principais agrupados em flavonóides, ácidos graxos, álcoois, aminoácidos, vitaminas e minerais (SANTOS *et al.*, 2007).

Desse modo, a abordagem química do extrato aquoso da própolis indicou a presença de classes de alguns compostos naturais, considerando os testes realizados para determinação de fenóis e taninos (Figura 1); e também para a determinação leucoantocianidinas, catequinas e flavonas (Figura 3) foi possível detectar a presença de taninos condensados e catequinas (taninos catéquicos) respectivamente. Esses compostos são usados como adstringente do tubo digestivo e em escoriações cutâneas. No tratamento de queimaduras, as proteínas dos tecidos expostos são precipitadas e formam um revestimento protetor ligeiramente anti-séptico, sob o qual pode ocorrer a regeneração dos tecidos (ROBBERS *et al.*, 1997).

Os testes realizados para a determinação de antocianinas, antocianidinas e flavonoides (Figura 2) indicou a presença de cor amarela tendendo à laranja indicando a presença de flavonóis, flavonas, flavonóis e xantonas. A ausência de outras classes de flavonóides que não foram sugeridas nas reações em tubo pode estar relacionada também às baixas concentrações, bem como nas misturas com vários constituintes reativos a presença de um pode mascarar a cor indicativa da presença de outro (MATOS, 2009).

De acordo com Silva *et al.*(2013) os flavonóides são a classe de grupo fenólicos que esta biologicamente ativo na própolis. Foram atribuídas diferentes funções na natureza a

vários flavonoides: compostos antimicrobianos, produtos do estresse de metabólicos ou moléculas sinalizadoras (ROBBERS *et al.*, 1997).

O mecanismo de atividade antioxidante atribuída aos flavonóides e taninos auxilia no processo de cura, já que os radicais livres são um fator importante na formação de lesões ulcerativas e erosivas do trato gastrointestinal (BORRELLI & IZZO, 2000; CARBONEZI *et al.*, 2007).

No ensaio realizado para a determinação de esteróides e triterpenoides (Lieberman-Burchard) identificou-se a presença de triterpenoides pentacíclicos. Os terpenóides vegetais têm papel proeminente, pois desempenham funções importantes como fitoalexinas, insetífugos, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agente de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais e moléculas de sinalização (ROBBERS *et al.*, 1997).

As saponinas em solução aquosa formam espuma persistente e abundante (Figura 5). Essas atividades provem do fato de apresentarem em sua estrutura uma parte lipofílica denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (SCHENKEL *et al.*, 2001). A espuma formada é estável à ação de ácidos minerais diluídos, diferenciando-se dos sabões comuns. Alguns dos compostos saponósidos desorganizam a membrana dos glóbulos vermelhos do sangue, o que pode levar à hemólise. Outra característica encontrada é a capacidade de complexar com esteróides, que é utilizada para explicar a ação antifúngica e hipocolesterolmiante (CUNHA & ROQUE, 2005). Do ponto de vista biológico, as saponinas desempenham papel importante na vida da planta, participando de funções reguladoras, protetoras e sanitárias.

Vale ressaltar que o estudo realizado representa uma etapa importante da caracterização biomolecular da ação da própolis sobre linhagens celulares em estudos *in vitro*, considerando que apresenta ação sobre a clonogênese de linhagens do sistema imunológico

envolvidas na resposta ao tratamento de tumores. Será relevante o conhecimento das possíveis frações da mistura que apresentem papel sobre mecanismo de inibição de clonogênese em linhagens tumorais, vista que alguns tipos de própolis apresentam propriedades terapêuticas adjuvantes ao tratamento do câncer.

5 - CONCLUSÃO

Grandes moléculas de origem vegetal são consideradas princípios ativos de diversos extratos vegetais. A prospecção química do extrato aquoso de própolis revelou a presença de componentes biologicamente ativos que desempenham papel importante no metabolismo vegetal, e quando presentes na própolis podem estar associados à atividade terapêutica. Os resultados gerados motivam outras áreas de pesquisas abrindo possibilidade de novas aplicações.

4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle do câncer de mama representa, atualmente, um dos grandes desafios para as políticas públicas de saúde no Brasil. Isto tem implicado no desenvolvimento de estratégias direcionadas, que culminam na disponibilidade de métodos de diagnósticos precoces, terapêutica específica e acompanhamento multidisciplinar aos pacientes.

Nossos estudos demonstraram o papel da própolis sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) e células de linhagem de adenocarcinoma de mama da linhagem MDA-MB-231. Através desses dados, pode-se dizer que a própolis mostrou um efeito estimulador de proliferação de células PBMCs e um efeito antiproliferativo para células tumorais MDA-MB-231, aumentando a taxa de morte celular.

Esse efeito citotóxico sobre células de câncer de mama humano MDA-231, mas não nas células normais PBMC, pode está relacionado ao composto CAPE, presente em amostras de própolis encontradas em outras localidades como China e Europa, porém não há registros de que a própolis brasileira apresente esta substância em sua composição.

Dessa forma, para confirmar nossos resultados são necessários estudos sobre os constituintes responsáveis por esse papel anti - proliferativo em células tumorais e proliferativo em células de defesa do sistema imunológico. Constituindo assim boa alternativa para um potencial uso da própolis em combinação com radioterapia para proteger células normais e quebrar a resistência de células tumorais levando-as a apoptose.

5 - REFERENCIAS

AGUERO, M.B.; GONZALEZ, M.; LIMA, B.; *et al.* Argentinean própolis from *Zuccagniapunctata* Cav. (Caesalpinaeae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Buenos Aires-Argentina, 2010. 58. p.194-201.

ALENCAR, S.M. *et al.* Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. *Ciencia rural* 35 909-915.

ALLER, SG; YU J; WARD, A; *et al.* Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*, 2009. 323. p.1718-1722.

ANTUNES, HA; NUNES, LA; SILVA, JWP; *et al.* Abelhas nativas (Apidae: Meliponina) e seus recursos florais em um fragmento de mata localizada em área urbana. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, 2012. 24. 1. jan./mar. p. 7-14.

ARAÚJO, KSS; JUNIOR, JFS; SATO; *et al.*; Propriedades físico-químicas e a capacidade antioxidante da própolis de abelhas sem ferrão (Meliponinae) e *Apis* de duas regiões do TO-Brasil. *Acta Amaz.* Vol.46, Manaus Jan/Mar.2016.

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

BANSKOTA AH, TEZUKA Y, KADOTA S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*; 15 (7):561–571.

BARBOSA, MH.; ZUFFI, FB.; MARUXO, HB.; *et al.* Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm*, 2009. 22. 3. p. 318-22.

BASIM, E., BASIM, H., & OZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, .2006. 77, 992–996.

BENKOVIC, V; ORSOLIC, N; KNEZEVIC, AH; *et al.* Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008a. 31. p. 167-72.

BENKOVIC, V; KOPJAR, N; HORVAT, K; *et al.* Evaluation of radioprotective effects of propolis and quercetin on human white blood cells in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008b. 31.17. p. 78-85.

BENKOVIC, V; KNEZEVIC AH; DIKIC, D; *et al.* Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated mice. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009. 60. p.129-138.

BRITO, NMB; SAMPAIO, PCM; CASTRO, AAH; *et al.* Características clínicas de mulheres com carcinoma ductal invasivo submetidas à quimioterapia neoadjuvante. *Rev Para Med.*, 2007. 21.4. p.1-10.

CAILLEAU R, OLIVÉ M, CRUCIGER QV: Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 1978

CAILLEAU, R. et al. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974. 53: 661-664.

CANTINELLI, FS; CAMACHO, RS; SMALETZ, O; *et al.* A oncopsiquiatria no câncer de mama: considerações a respeito de questões do feminino. *Rev PsiquiatrClín*, 2006. 33. 3. p. 124-33.

CHAILLOU, L., & NAZARENO, M. A. Bioactivity of propolis from Santiago Del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT – Food Science and Technology*, . 2009. 42, 1422–1427.

CHEN, CN; WENG, MS; WU, CL; *et al.* Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2004.1. p. 175-185.

CROCETTI, E; CROTTI, N; FELTRIN, A; *et al.* The use of complementary therapies by breast cancer patients attending conventional treatment, *Eur. J. Cancer*, 1998. 34. p.324 – 328.

CUNHA, MA; OLIVEIRA, MS; LIMA, DP. As bases genéticas de formação do câncer: revisão de literatura. *Safety, Health and Environment World Congress*. São Paulo, BRAZIL, 2010.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardiotônicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo

esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 432-482.

EGGERT, YB. Descrição morfológica do intestino da abelha *Tetragona clavipes* (Hymenoptera, Apidae) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – SETOR PALOTINA, 2016.

DAUGSCH, A; MORAES, CS; FORT, P; *et al.* Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2007. 5. 4. p.435-441.

DE SOUSA JP, Leite MF, Jorge RF, Resende DO, da Silva Filho AA, Furtado NA, Soares AE, Spadaro AC, de Magalhaes PM and Bastos JK: Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. Evid Based Complement Alternat Med 2011: 464289, 2011

DELVES, PETER, *et al.* Roid's Essential Immunology, 11° Ed. Malden, Mas: Blackwell, 2006.

DIGIANNI, LM; GARBER, JE; WINER EP. Complementary and alternative medicine use among women with breast cancer, J. Clin. Oncol. 2002. 20. 18. p.34–38.

DOS SANTOS CR, ARCENIO F, CARVALHO ES, *et al.* 2003. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Rev Bras Farmacogn* 13: 71-74.

EBEID, AS; MONEIM, NA; BENHAWY, AS; *et al.* Assessment of the radioprotective effect of própolis in breast cancer patients undergoing radiotherapy. New perspective for an old honey bee product. Radiation Research. 2016. p.1-10.

ESTIMATIVA 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

FALCÃO, PL; MOTTA, BM; LIMA, FC; *et al.* Aumento de viabilidade de clones radiosensível (PBMC) e resistente (MDA-MB-231) na cobaltoterapia em taxa de dose reduzida. Radiol Bras. 2015. 48. p.158–165.

FOOD INGREDIENTES BRASIL N. 6 – 2009, www.revista-fi.com

FREITAS, B. M. Meliponíneos: A Vida das Abelhas. In: SIMPÓSIO DE HEMIPETERA, Fortaleza, 2003. 1 CD- ROM.

FURTADO, CM; MARCONDES, MC; SOLA-PENNA, M; *et al.* Clotrimazole preferentially inhibits humn breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. *PLoS One* 7, 2012. 30462.

GAZZINELLI, G; KATZ, N; ROCHA, RS; *et al.* Immune Response During Human SchistosomiasisMansoni. X. Production And Standardization Of An Antigen-Induced MitogenicActivity By Peripheral Mononuclear Cells From Treated, But Not Active Cases Of Schistosomiasis. *J. Immunol.* 1983. 130. 2891.

GEY GO, COFF MAN WD, KUBICEK MT: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 1952,12:264-265.

GODINHO, ER; KOCH, HA. Rastreamento do CA de mama: aspectos relacionados ao médico. *Radiol Bras.* 2004. 37. 2 p.91-9.

GOODMAN, LS; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10º ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 2003. p 1043- 1045, 1048-1051, 1061, 1068.

HADDAD, CF. Trastuzumab no câncer de mama. *Femina.* 2010. 38. 2. p.73-77.HALL, EJ. *Radiobiology for the radiologist*, 5th ed. J.B. Philadelphia: Lippincott, 2000.

HALL, E. J. *Radiobiology for the radiologist*, 5th ed. J.B. Lippincott, Philadelphia, 2000.

HAVSTEEN, BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids.*Pharmacology&Therapeutics*, 2002. 96. 2-3. p.67-202.

HERNANDEZ, IM; CUESTA-RUBIO, O; FERNANDEZ, M.C; *et al.* Studies on the constituents of yellow Cuban própolis: CG-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010.58.p.4725-4730.

HOLLIDAY DEBORAH; SPEIRS VALERIE Choosing the right cell line for breast câncerresearch.*Breast Cancer Research* 2011, **Z3**:215.

HOSSEINIMEHR, SJ. Trends in the development of radioprotectiveagents.*Drug Discovery Today*, 2007. 12. 19-20. p.794-805.

HUANG, S; ZHANG, CP; WANG, K; *et al.* Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*,2014. 19. p.19610–19632.

INTERCOOP. Programas ambientais de resgate de fauna e flora da UHE Mauá, no rio Tibagi, entre os municípios de Telêmaco Borba e Ortigueira, no estado do Paraná. Relatório Técnico Final de Monitoramento - Núcleo de Resgate de Abelhas Nativas sem Ferrão. Curitiba, Cooperativa Interdisciplinar de Serviços Técnicos. Relatório técnico de distribuição restrita. 2013. 367 p.

ISHIHARA, M; NAOI, K; HASHITA, M; *et al.* Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncology Reports*, 2009. 22. p.349-354.

ITO, J; CHANG, FR.; WANG, HK; *et al.* Anti-AIDS agents. 48.1 Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, 2001. 64. 10. p.1278-1281.

KALOGEROPOULOS, N., KONTELES, S. J., TROULLIDOU, E., *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 2009.116, 452–461.

KARBOWNIK, M; REITER, RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 2000. 225. p.9e22.

KIM, W., SEONG, K. M., & YOUN, B. Phenylpropanoids in radioregulation: Double edged sword. *Experimental & Molecular Medicine*, 2006.43, 323e333.

KIMOTO T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M and Mito K: Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev.* 1998. 22: 506-515,.

KOO H, PARK YK, IKEGAKI M, CURY JA, ROSALEN PL. Effect of *Apismellifer* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. 1999. *Caries Res* 33: 393-400.

KROL, W; CZUBA, Z; SCHELLER, S; *et al.* Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochemistry International*, 1990. 21. 4. p.593-597.

KUMAZAWA, S; HAMASAKA, T; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins *Food Chemistry*, 2004. 84. 3. p.329-339.

LASFARGUES EY, OZZELLO L: Cultivation of human breast carcinomas. *J NatlCancerInst*1958, 21:1131-1147.

LEMOS, FA; LIMA, RAG; MELLO, DF. Assistência à criança e ao adolescente com câncer: a fase da quimioterapia intratecal. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Ribeirão Preto, 2004. 12. 3.

LI, H.; KAPUR, A.; YANG, J. X.; SRIVASTAVA, S.; MCLEOD, D. G.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; DAUGSCH, A.; PARK, Y. K.; RHIM, J. S. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *InternationalJournalofOncology*, 2007 v.31, n.3, p.601-606.

LISBOA, LF. Tendências da incidência e da mortalidade do CA de mama no município de São Paulo. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2009.

LIU, S.Z. Onradiationhormesisexpressed in theimmune system. *Cri. Ver. Toxicol.* 2003. 33. 3-4. p. 431-441.

LIU Y; APPLEYARD MV; COATES PJ; *et al.* p53 and gamma radiation in the normal breast.*Int J RadiatBiol*, 2009. 85. p.1026-31.

LONGHINI R, RAKSA SM, OLIVEIRA ACP, SVIDZINSKI TIE, FRANCO SLObtensão de extratos de própolis sobdiferentes condições e avaliação de sua atividadeantifúngica. *Rev Bras Farmacogn.* 2007. 17: 388-395.

LORIMORE, S.A., P.J. COATES, G.E. SCOBIE *et al.* Inflammatory-Type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene* 20(48): 7085-7095 (2001).

MARIA, RM. Estudo de metabolismo de célula de câncer de mamasubmetidos a CLA usando RMN [Tese de doutorado]. 2013: INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO PAULO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. São Carlos, SP.

MARTÍNEZ-CARPIO ,P.A. et al. «Constitutive and regulated secretion of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in MDA-MB-231 breast cancer cell line in 11-day cultures». *CellularSignalling*. 1999.**11** (10): 753-757.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MATOS VR. Caracterização química e palinológica da própolis produzida no litoral norte do estado da Bahia[Dissertação de Mestre] Feira de Santana, BA: Universidade Estadual de Feira de Santana – BA 2012

MATSUNO T, JUNG SK, MATSUMOTO Y, SAITO M AND MORIKAWA J: Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res*, 1997 17: 3565-3568.

MATSUSHIGE, K; USUMOTO, K; AMAMOTO, Y; *et al.* Quality evaluation of própolis. 1 A comparative study on radical scavenging effects of própolis and vespaenidus. *JournalofTraditional Medicines*, 1996. 12. p.45-53.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas, *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 2005. 72. 3. p.405-411.

MINISTERIO DA SAUDE (BR). INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Falando sobre cancer de mama. Rio de Janeiro. INCA, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Controle de câncer de mama: documento de consenso. Rio de Janeiro. INCA, 2004.

MIYAHIRA, ANDREA. "Types of immune cells present in human PBMC". *sanguinebio.com*. Retrieved 23 Sep 2014.

MONTORO, A; BARQUINERO, JF; ALMONACID, M; *et al.* Concentration-Dependent Protection by Ethanol Extract of Propolis against gamma-Ray-Induced Chromosome Damage in Human Blood Lymphocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.p.1-7.

MORRIS, K; JOHNSON, N; HOMER, L; *et al.*A comparison of complementary therapy use between breast cancer patients and patients with other primary tumor sites, *Am. J. Surg.*, 2000.179. p.407–411.

MUNIZ MP; CARVALHO-ZILSE GA; NUNOMURA RCS; et al. Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos em metanol e etanol da própolis de abelhas sem ferrão amazônicas XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC C Pq/FAPEAM/INPA Manaus –2009

MURAD, AM; KATZ A. Oncologia: bases clínicas do tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.41.

STANDISH, LJ; SWEET, ES; NOVACK; *et al* Breast cancer and immune system. *Journal Soc. Integr. Oncology*, .2008. 6. 4. p.158-168.

ORSOLIC, N; BENKOVIC, V; KNEZEVIC, AH; *et al*. Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of própolis and its polyphenolic compounds. *Biol Pharm Bull*, 2007. 30. p.946-951.

PARK YK, KOO H, IKEGAKI M, et al 1998a. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Cur Microbiol* 34: 24-28.

PARK YK, KOO H, IKEGAKI M, CURY JA, ROSALEN PL, ABREU JAS 1998b. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Rev Microbiol* 29: 143-148.

PARK, YK.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998. 62. 11. p.2230-2232.

PARK, YK; ALENCAR, SM; AGUIAR, CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50. 9. p.2502-2506.

PARK, YK; PASREDES-GUZMAN, JF; AGUIAR, CL; *et al*. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. 52. 5. p.1100-1103.

PARK, JI; CAO, L; PLATT, VM; *et al*. Terapia antitumoral mediada por 5-fluorocytosine e uma proteína de fusão recombinante contendo TSG-6 ácido hialurônico: deaminase do. *Mol Arcanjo*, 2009. 6. p.801-812.

PAUL, P; UNNIKRISHNAN, MK; NAGAPPA, AN. Phytochemicals as radioprotective agents. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2011. 2. p.137-150.

PEREZ, CA; MICHALSKI, JM; LOCKETT, MA. Chemical disease-free survival in localized carcinoma of prostate treated with external beam irradiation: comparison of American Society of Therapeutic Radiology and Oncology Consensus or 1ng/ml as endpoint. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 2001. 49. 5. p.1287-296.

PEROU CM, *et al.*: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406:747-752

PINHEIRO, Vladimir Martins. Respostas Imunes, Primária e Secundária, de Células Mononucleares do Sangue Periférico, *in vitro*, de Indivíduos Não Infectados e de Pacientes com Doença de Chagas, estimuladas com Antígenos de *Trypanosoma cruzi*. 2007. (Mestrado em Ciências da saúde: infectologia e medicina tropical) - Faculdade de medicina Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PISCO, L; KORDIAN, M; PESEKE, K; *et al.* Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. 41. 3. p.401-407.

POTTI, A; WILLARDSON, J; FARSCEN, C; *et al.* Predictive role of HER-2/neu overexpression and clinical features at initial presentation in patients with extensive stage small cell. *Lung Cancer*, 2002. 36. p. 257-261.

REIS CMF, CARVALHO JCT, CAPUTO LRG, *et al.* Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. *Ver Bras Farmacogn.* 2000. 9/10: 43-52.

RITHIDECH, KN; TUNGJAI, M; WHORTON, EB. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. *Mutation Research*, 2005. 585. 1-2. p.96-104.

ROBBERS EJ, SPEEDIE KM, TYLER EV. *Farmacognosia e farmacobiotechnologia*. Editorial Premier: A ciência em livros, 372. 1997.

ROSS, J. A; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 2002. 22. p.19-34.

RUSSO, A; CARDILE, V; SANCHEZ, F; *et al.* Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*, 2004. 76. p.545-558.

SALATINO, A; TEIXEIRA, EW; NEGRIL, G; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. 2^o ed, Cambridge: Oxford University Press., 2005. p.33–38.

SANKARANARAYANAN, K. Estimation of the genetic risks of exposure to ionizing radiation in humans: Current status and emerging perspectives. *Journal of Radiation Research*, 2006. 47. p.57 - 66.

SANTOS, MJ.; VIANNA, LA. C.; GAMBA, M. A.; Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. *Acta Paul Enferm.* 2007;20(2):199-204.

SANTOS, Geyza Spigoti. Avaliação do efeito radiomodificador da própolis em células de ovário de hamster chinês (cho-k1) e em células tumorais de próstata (pc3), irradiadas com CO-60. 2011. . Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações. INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES IPEN-CNEN/SP Autarquia associada à Universidade de São Paulo.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFGRS/Ed. UFSC, 2001. cap.27, p.597-619.

SHIRAZI, A; GHOBADI, G; GHAZI-KHANSARI, M. A radiobiological review on melatonin A novel radioprotector. *Journal of Radiation Research*, 2007. 48. p.263-272.

SAFWAT A. The immunobiology of low-dose total body irradiation: more questions than answers. *Radiat. Res.*, 2000. 153. 5. p.599-604.

SCOTT, S. L.; EARLE, J. D.; GUMERLOCK, P. H. Functional p53 Increases Prostate Cancer Cell Survival After Exposure to Fractionated Doses of Ionizing Radiation. *Cancer Research*, v.63, n.21, p.7190-7196, 2003.

SILICI, S; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005.99. 1. p.69-73.

SILVA, J. F. M., SOUZA, M. C., MATTA, S. R., et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 2006.99,431–435.

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

SILVAEC, MUNIZ CMP, NUNOMURA RCS. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas, *Quim. Nova*, 2013. Vol. 36, No. 5, 628-633.

SFORCIN, JM; FERNANDES, JUNIOR, A; LOPES, CA; *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000. 73. 1-2. p.243-249.

SHIMIZU, K; DAS, SK; HASHIMOTO, T; *et al.* Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 2005. 44. 4. p.293-299.

SIMÕES CC, ARAÚJO DB, ARAÚJO RPC. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev Bras Farmacogn.* 2008 18: 84-89.

SMELTZER, SC; BARE BG. BRUNNER; SUDDARTH. Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 3.

SOARES AKA, CARMO GC, QUENTAL DP, *et al.* Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Rev Bras Farmacogn.* 2006. 16: 447-454.

United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation – UNSCEAR. SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION, UNITED NATIONS: NEW YORK, 2008. 2.

UZEL, A., SORKUN, K., ONCAG, O., *et al.* (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160, 189–195.

VIJAYALAXMI; REITER, RJ; TAN, DX; *et al.* Melatonin as a radioprotective agent: A review. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2004. 59. 3. p.639-653.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNANDEZ-LOPEZ, J., *et al.* Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *Journal of Food Science*, 2008. 73, 117–124.

WATANABE MA, Amarante MK, Conti BJ and Sforcin JM: Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol*, 2011. 63: 1378-1386.

WEISS, JF; LANDAUER, MR. History and development of radiation-protective agents. *International Journal of Radiation Biology*, 2009. 85. p.539-537.

WITTER, S; LOPES, LA; LISBOA, BB; *et al.* Abelhas sem ferrão no Rio Grande do Sul: distribuição geográfica, árvores importantes para nidificação e sustentabilidade regional. APACAME. Porto Alegre-RS. 2009. p. 1-4.

WU, J; OMENE, C; KARKOSZKA, J; *et al.* 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 Letters*, 2011. 308. p.43–53.

ZUCALI, R. A conservação da mama: indicações e técnicas da quadrantectomia, dissecação axilar e radioterapia no câncer de mama. São Paulo: Ícone, 1992. 171 p.

WU, J; OMENE, C; KARKOSZKA, J; *et al.* 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 Letters*, 2011. 308. p.43–53.

ZUCALI, R. A conservação da mama: indicações e técnicas da quadrantectomia, dissecação axilar e radioterapia no câncer de mama. São Paulo: Ícone, 1992. 171 p.