

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 28/11/2017.



Botucatu
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

YAHIMA FRIÓN HERRERA

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS
BRASILEIRA E CUBANA CONTRA CÉLULAS TUMORAIS
HUMANAS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin
Coorientador: Prof. Dr. Alexis Diaz Garcia

Yahima Frión Herrera

ATIVIDADE CITOTÓXICA DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS
BRASILEIRA E CUBANA CONTRA CÉLULAS TUMORAIS
HUMANAS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin
Coorientador: Prof. Dr. Alexis Díaz Garcia

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Herrera, Yahima Frión.

Atividade citotóxica de amostras de própolis brasileira e cubana contra células tumorais humanas / Yahima Frión Herrera. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Mauricio Sforcin

Coorientador: Alexias Diaz Garcia

Capes: 21006008

1. Própole. 2. Apoptose. 3. Morte celular. 4. Necrose. 5. Citotoxicidade imunológica. 6. Expressão gênica. 7. Microscopia de fluorescência.

Palavras-chave: Apoptose; Citotoxicidade; Necrose; Própolis.

AGRADECIMENTOS

Ao programa AUIP-PAEDEX 2013 por me ter dado a oportunidade de realizar meus estudos de doutorado no Brasil.

À professora Denise Fechio, coordenadora do programa de pós-graduação em Patologia, os meus sinceros agradecimentos, pela acolhida na minha chegada ao Brasil.

À Vânia Soler, secretária do programa de pós-graduação em Patologia, pela disponibilidade sempre demonstrada, pelo carinho e amizade, e por me ter salvado do inverno tão frio em Botucatu.

Agradeço ao meu orientador professor José Maurício Sforcin e ao meu coorientador Alexis Diaz Garcia, por seus ensinamentos. Aprendi muito e sou muito grata por tudo.

Aos colaboradores do laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí em Cuba: Jenny, Hermis, Arianna e Leo, por tudo o apoio e ajuda indispensável em tantos experimentos e realização deste trabalho.

A todas as pessoas que fizeram parte da minha vida, contribuindo para minha formação profissional e pessoal.

Aos professores, colegas e funcionários do programa de pós-graduação em Patologia e do departamento de Microbiologia e Imunologia.

Aos amigos brasileiros que fiz ao longo destes 3 anos. Obrigada pela convivência e bons momentos.

Ao David, Lesvi e Hans. Dizem que amigos são os familiares que podemos escolher. Se eu precisasse escolher minha família, certamente teria escolhido vocês! Obrigada por todos os momentos de imensa alegria! E, também, pela companhia nos momentos complicados que tive no Brasil.

À minha família, em especial aos meus pais e minha irmã, pelo apoio e amor.

Muito obrigada!

RESUMO

A própolis é um produto elaborado por abelhas a partir da matéria vegetal coletada ao redor da colmeia. Recentes pesquisas têm identificado o potencial terapêutico da própolis, tais como: antimicrobiano, antiviral, anti-inflamatório, antitumoral, cicatrizante, imunoestimulante, hepatoprotetor, entre muitos outros. Atualmente, muitos estudos que envolvem amostras de própolis de diferentes regiões têm focalizado a descoberta de candidatos promissores para o tratamento do câncer. Nesse sentido, o efeito anti-proliferativo e citotóxico de amostras de própolis verde do Brasil (PB) e vermelha de Cuba (PC) foi avaliado em linhagens de células tumorais humanas de origem epitelial (A549, Hep-2, MDA-MB-231) e em células não tumorais (Vero) pelo ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e lactato desidrogenase (LDH). O mecanismo molecular envolvido na morte celular das linhagens tumorais como apoptose/necrose foi determinado por coloração fluorescente com laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE), diamidinofenilindol (DAPI), permeabilização da mitocôndria mediante alteração do potencial de membrana mitocondrial, e pela expressão dos genes pro-apoptóticos (*TP53*, *CASP3*, *BAX*, *NOXA*, *PUMA*, *P21*) e anti-apoptóticos (*BCL2*, *BCL-XL*) mediante transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). As células tumorais A549 e HEP-2 apresentaram redução significativa da viabilidade celular pela ação citotóxica de PB (IC_{50} : $69,17 \pm 11,28 \mu\text{g/ml}$, IC_{50} : $64,1 \pm 14,6 \mu\text{g/ml}$ respectivamente). Esta amostra induziu morte celular por apoptose nas duas linhagens tumorais, evidenciado pela condensação da cromatina, alteração do potencial de membrana mitocondrial, aumento da expressão dos genes pro/apoptóticos e redução da expressão dos genes anti-apoptóticos. Referente à viabilidade da linhagem MDA MB-231, esta não foi afetada pelo tratamento com PB. Os efeitos citotóxicos induzidos pela amostra PC nas linhagens HEP-2 e MDA MB-231 foram diferentes (IC_{50} : $56,2 \pm 9,2 \mu\text{g/ml}$, IC_{50} : $67,27 \pm 12,8 \mu\text{g/ml}$ respectivamente). A morte celular por apoptose foi evidenciada na linhagem HEP-2 pela condensação da cromatina, aumento da expressão dos genes pro-apoptóticos, redução dos genes anti-apoptóticos, geração de espécies reativas do oxigênio e alteração do potencial de membrana mitocondrial. Porém, na linhagem MDA MB-231, foi evidenciada a morte celular por necrose com liberação da enzima LDH,

geração de espécies reativas do oxigênio, afetação do potencial de membrana mitocondrial, interferência na migração celular, e redução da expressão dos genes pro-apoptóticos sem alteração das vias de sinalização PI3K/Akt ERK1/2. Nossos dados permitiram concluir que o efeito citotóxico e tipo de morte celular induzido pela própolis dependem da composição química, origem geográfica da amostra e fontes vegetais. Ainda são necessários estudos correlacionando a composição química com a atividade biológica, definindo cada tipo de própolis com a sua aplicação terapêutica para o tratamento de câncer.

PALAVRAS-CHAVES: própolis, citotoxicidade, apoptose, necrose

ABSTRACT

Propolis is produced by bees from plant material collected around the hive. The efficacy of propolis in some treatments has been associated to its important activities such as antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, antitumor, healing, immunostimulant, hepatoprotective, and many others. Currently, many studies involving propolis samples from different regions have focused on the discovery of promising candidates for the treatment of cancer. The antiproliferative and cytotoxic activities of Brazilian green propolis (BP) and Cuban red propolis (CP) against a panel of epithelial human tumor cell lines (A549, Hep-2, MDA-MB-231) and non-tumor cells (Vero) were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase assay (LDH). Additionally, the effect of both samples of propolis on tumor cell death by apoptosis/necrosis was assayed by fluorescence microscopy and the expression pro-apoptotic genes (*TP53*, *CASP3*, *BAX*, *NOXA*, *PUMA*, *P21*) and antiapoptotic genes (*BCL-2*, *BCL-XL*) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Brazilian propolis displayed antiproliferative and cytotoxic effects on A549 cells and HEp-2 in a dose-dependent manner (IC_{50} : $69.17 \pm 11.28 \mu\text{g/ml}$, IC_{50} : $64.1 \pm 14.6 \mu\text{g/ml}$, respectively). Apoptotic cell death was evidenced in both tumor cells by chromatin condensation, overexpression of pro-apoptotic genes, down-expression of antiapoptotic gene and reduction of mitochondrial membrane potential. In contrast, BP did not affect the viability of MDA MB-231 cells. Cuban propolis revealed a dose-dependent cytotoxic effect on HEp-2 and MDA MB-231 cells (IC_{50} : $56.2 \pm 9.2 \mu\text{g/ml}$, IC_{50} : $67.27 \pm 12.8 \mu\text{g/ml}$ respectively). The effects of CP on cell death were different in HEp-2 and MDA MB-231 cells, what indicated that CP exerted its cytotoxic effects in HEp-2 cells by inducing apoptosis, regulating the over expression of pro-apoptotic genes, down-expression of antiapoptotic gene and decreasing mitochondrial membrane potential with possible association of reactive oxygen species production. In MDA MB-231 cells, CP induced necrosis associated with reactive oxygen species production, LDH release and reduction of mitochondrial membrane potential and down-expression of apoptosis-related genes. CP effects on breast cancer cells were associated to a decreased cell migration but not to modification of PI3K/Akt and

ERK1/2 pathways. Our results indicated that propolis samples displayed a differential cytotoxicity due to their chemical compositions, which depend on the geographical region and vegetal source, what may influence its biological activity. Further investigation is needed to correlate the chemical composition with the biological activity, defining the therapeutic application of each type of propolis regarding cancer treatment.

Keywords: propolis, cytotoxicity, apoptosis, necrosis

SUMÁRIO

1.- INTRODUÇÃO.....	1
2.- OBJETIVOS.....	3
3. - REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1.- Câncer: Visão geral	4
3.1.1.- Câncer de pulmão	5
3.1.2.- Câncer de laringe	6
3.1.3.- Câncer de mama	7
3.2- Avaliação citotóxica sobre linhagens tumorais	9
3.2.1 - Testes indicados na avaliação citotóxica	10
3.3.- Produtos naturais e câncer	14
3.3.1.- Própolis: Visão geral	15
3.3.2.- Própolis brasileira	17
3.3.3.- Própolis cubana	19
3.3.4.- Atividade antitumoral da própolis	20
4.- REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	25
5.- ARTIGOS CIENTÍFICOS	38
5.1.- Brazilian propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway	40
5.2.- Cytotoxic effect of Cuban and Brazilian propolis in human laryngeal epidermoid carcinoma cells: a preliminary in-vitro comparison	50
5.3.- Cuban propolis induces necrosis in breast cancer cells	71
6. – CONCLUSÕES.....	93

1.- INTRODUÇÃO

Câncer é o nome genérico dado a uma série de doenças, cuja principal característica é o crescimento e divisão descontrolados de células anormais. O processo se inicia quando células de algum tecido ou órgão do corpo começam a crescer de forma desordenada, gerando células anômalas, que podem se multiplicar adquirindo capacidade invasiva (1-4).

Cerca de 10% dos casos de câncer são hereditários. A maioria dos causadores desta enfermidade tem relação direta com fatores ambientais e hábitos de vida, tais como tabagismo, consumo excessivo de álcool, sedentarismo, alimentação inadequada e exposição exagerada ao sol ou à alguns microrganismos (5, 6).

O número de casos de câncer na população mundial cresceu nas últimas décadas. Segundo estimativas mundiais surgem a cada ano nove milhões de novos casos e cinco milhões de pessoas vão a óbito em sua decorrência. Em 2030, a estimativa global será de 21,4 milhões de novos casos, seguidos de 13,2 milhões de mortes em consequência ao aumento da expectativa de vida da população. Em ambos os sexos, a taxa de incidência está aumentando. Observa-se entre os homens um aumento principalmente no desenvolvimento de câncer de pulmão, próstata e coloretal. Entre as mulheres, as principais neoplasias malignas com maior incidência são: câncer de mama, pulmão e coloretal (5-10).

Ao longo dos anos, as pesquisas na área oncológica apresentaram avanços consideráveis. O desenvolvimento de novos medicamentos, tecnologias e o melhor entendimento da biologia tumoral favoreceram marcadores para a detecção, aumentando o sucesso do tratamento e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (11-13).

A descoberta de anticancerígenos de origem natural tem fornecido vários recursos e subsídios para o desenvolvimento de pesquisas nesta área (14-18). A maioria dos fármacos antineoplásicos (60%) introduzidos na terapêutica moderna são de origem natural (14-21). Os fitoquímicos possuem boas perspectivas como agentes antitumorais por apresentarem grande diversidade química e ilimitada possibilidade nas modificações racionais, oferecendo as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (14-17). Dentre os produtos naturais com potencial anti-neoplásico que vêm sendo extensivamente estudados, destaca-se a própolis (22-31). Este produto é uma

resina balsâmica produzida por abelhas do gênero *Apis* e utilizada pelas mesmas na proteção das colmeias contra invasão de insetos e microrganismos (32).

A própolis tem conquistado o status de apiterápico por demonstrar amplas ações biológicas como efeitos antimicrobiano, antimicótico, imunomodulador, cicatrizante e antioxidante (23, 33-38). Estudos adicionais têm demonstrado que os efeitos atribuídos a este produto natural dependem da sua composição química, a qual varia de acordo com sua origem geográfica (23, 26, 39-46).

Diante do exposto, este trabalho propõe-se a avaliar o efeito citotóxico de amostras de própolis cubana e brasileira sobre células tumorais.

6. - CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem chegar às seguintes conclusões:

- ✓ As linhagens tumorais A549 e HEP-2 foram sensíveis ao efeito citotóxico ocasionado pela própolis brasileira. O evento envolvido na morte celular das mesmas foi a apoptose. Entretanto, a viabilidade celular da linhagem MDA MB-231 não foi afetada por esta amostra de própolis.
- ✓ As linhagens HEP-2 e MDA MB-231 foram sensíveis ao efeito citotóxico induzido pela própolis cubana. Os eventos envolvidos na morte celular das mesmas foram apoptose e necrose, respectivamente.
- ✓ O efeito citotóxico e tipo de morte celular induzido pelas amostras de própolis é dependente da composição química, a qual está relacionada à região geográfica em que a amostra foi produzida e às fontes vegetais.
- ✓ A utilização de amostras de própolis brasileira e cubana pode levar à descoberta de novas substâncias bioativas para o tratamento do câncer.