



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA



POSSÍVEL AÇÃO SINÉRGICA DE COMPONENTES DA PRÓPOLIS SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA DE LARINGE HUMANA (HEp-2): MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E MORTE CELULAR

LÍVIA MATSUMOTO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof. Dr. José Maurício Sforcin

**BOTUCATU – SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

POSSÍVEL AÇÃO SINÉRGICA DE COMPONENTES DA
PRÓPOLIS SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA DE
LARINGE HUMANA (HEp-2): MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA E MORTE CELULAR

LÍVIA MATSUMOTO DA SILVA

PROF. DR. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof. Dr. José Maurício Sforcin

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Amélia por sempre confiar em mim e apoiar em minhas decisões. Por sempre me amar, me ajudar e ser meu exemplo de luta e força.

À minha irmã Vivian pela amizade, companheirismo e compreensão de sempre.

À minha tia Irene por toda ajuda, preocupação e carinho que sempre teve comigo.

Ao meu pai Abinadab, por sempre me apoiar nos estudos.

À Deus e à vida por me proporcionarem experiências que sempre trazem aprendizado, maturidade, empatia e autoconhecimento.

Agradeço ao dia em que tive contato pela primeira vez com uma revista Fapesp da minha prima Esther, durante os primeiros anos da graduação, sem ao menos saber o que ela significava, mas cuja capa falava sobre pesquisas com abelha, que me despertaram enorme interesse.

À todos os professores pelos quais tive a oportunidade de ser orientada durante a graduação e especialização.

Ao meu atual orientador Prof. Adj. José Mauricio Sforcin, pela oportunidade de realizar o sonho de fazer o mestrado pesquisando um produto da abelha.

Às amigas e colaboradoras Yahima, por toda paciência e ajuda fundamental, serei sempre grata pela contribuição na minha vida acadêmica; e Ariane, a irmã que ganhei na UNESP, obrigada pela parceria, ajuda nos trabalhos e conversas intermináveis.

Às colegas de laboratório Eliza e Fernanda, pela parceria e convivência durante esses anos.

Aos amigos estudantes, técnicos e funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia, Ivy, Daniela, Regis, Jacqueline, Cláudia, Jofer, Caru, Hans, Thaís, Larissa, Aline, Silvia, Lula e Rafael, por toda ajuda tanto na pesquisa quanto nas conversas do dia a dia.

À todas amigas e amigos que estiveram comigo durante minha trajetória, me apoiando, escutando, me distraindo, me divertindo, dividindo sentimentos bons e ruins. Em especial às amigas Melanie, Aline Pomba, Ana Paula, Lisa e Natalia; e aos amigos Douglas, Rafa Evangelho, Aléssio e Albane.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada e ao Instituto de Biociências da UNESP Botucatu pela oportunidade.

À Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (processo FAPESP: 2014/13245-4), pelo suporte financeiro.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram durante meu trajeto e para o desenvolvimento de minha dissertação.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Livia Matsumoto da.

Possível ação sinérgica de componentes da própolis sobre células de carcinoma de laringe humana (HEp-2) : mecanismos de resistência e morte celular / Livia Matsumoto da Silva. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Mauricio Sforcin

Capes: 21007004

1. Própole. 2. Fenóis. 3. Citotoxicidade. 4. Células. 5. Glicoproteínas.

Palavras-chave: Células HEp-2; Citotoxicidade; Compostos fenólicos; Glicoproteína-P; Própolis.

“Cada pessoa tem seu próprio deserto a atravessar. E a cada vez será necessário desmascarar as miragens e também contemplar os milagres: o instante, a aliança, a doura ignorância e a fecunda vacuidade.”

Jean-Yves Leloup

<i>Revisão de Literatura</i>	8
Resumo	9
1. Câncer: características gerais	11
2. Produtos naturais e câncer	12
3. Própolis	13
4. Ácidos fenólicos	14
5. Mecanismos antitumorais da própolis e seus principais componentes	16
5.1. Morte celular	17
5.2. Parada do ciclo celular	18
5.3. Influência da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) sobre a viabilidade celular ¹⁹	
6. Papel da própolis sobre glicoproteína-P (P-gp)	20
<i>Material e métodos</i>	23
1. Obtenção e manutenção das células do carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2)	24
2. Preparo das variáveis	24
2.1. Própolis:	24
2.2. Ácidos fenólicos:	25
2.3. Etanol 70%:	25
3. Viabilidade celular pelo método de MTT	25
4. Seletividade da própolis sobre células não tumorais (Vero)	26
5. Avaliação de apoptose e necrose	26
6. Parada do ciclo celular	27
7. Influência da geração de espécies reativas de oxigênio sobre a viabilidade celular	27
8. Tratamento de células HEp-2 com própolis em combinação com inibidor de P-gp	27
9. Análise estatística	28
<i>Resultados e discussão</i>	29
1. Viabilidade celular	30

2. Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo	33
3. Influência da própolis e seus componentes fenólicos isolados na parada do ciclo celular de HEP-2.....	33
4. N-acetilcisteína diminui o efeito citotóxico da própolis e Caf em células HEP-2.....	35
5. Modulação do efeito citotóxico de DOX pela inibição da atividade da P-gp em células HEP-2.....	36
Referências:	42
<i>Capítulo I - Manuscrito</i>	50

Revisão de Literatura

Resumo

Própolis e seus compostos fenólicos são conhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes e anticâncer. Recentemente, os mecanismos de ação da propolis têm sido objeto de investigação. Este estudo teve como objetivo elucidar os efeitos da propolis e três compostos fenólicos (ácido cafeico - Caf, ácido dihidrocinâmico - Cin; ácido *p*-cumárico - Cou) na mesma proporção que são encontrados em nossa amostra de propolis, isoladamente ou em combinação, sobre células de carcinoma epidermóide de laringe humano (HEp-2). A viabilidade celular, tipo de morte e parada do ciclo celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a possível capacidade da propolis em induzir o efluxo de doxorubicina (DOX) via inibidor de glicoproteína-P (P-gp) foram avaliadas. A propolis exerceu um efeito citotóxico em células HEp-2 e apresentaram um valor de IC₅₀ igual a 80 µg/mL, enquanto que os compostos isolados (isoladamente ou em combinação) não mostraram efeito sobre a viabilidade celular após 72 h. Assim, concentrações mais elevadas destes compostos foram testadas e Caf (IC₅₀: 1.332 µM) induziu necrose em células HEp-2, enquanto que a propolis induziu apoptose em células HEp-2, ambos, provavelmente devido à geração de ROS. A amostra de propolis induziu parada do ciclo celular na fase G2/M e Caf na fase S. Própolis ou seus componentes, com exceção de Caf, pode agir como um potencial inibidor de P-gp por modulação da atividade da P-gp, inibindo o efluxo de DOX. Sendo assim, os dados sugeriram que a propolis exerceu efeitos citotóxicos contra células HEp-2 e alguns mecanismos são discutidos. O seu potencial como um fármaco anti-tumoral deve ser investigado em ensaios futuros.

Palavras-chave: Própolis; Compostos fenólicos; Efeito citotóxico; células HEp-2.

Abstract

Propolis and its phenolic compounds are known for their antioxidant and anticancer properties. Propolis mechanisms of action have been the subject of research recently. This study aimed to elucidate the effects of propolis and three phenolic compounds (caffeic acid – Caf; dihydrocinnamic acid – Cin; *p*-coumaric acid – Cou) in the same proportion they are found in our propolis sample, alone or in combination, towards human larynx epidermoid carcinoma (HEp-2) cell. Cell viability, apoptosis/necrosis and cell cycle arrest, generation of reactive oxygen species (ROS) and the ability of propolis to induce doxorubicin (DOX) efflux using a P-glycoprotein (P-gp) inhibitor (verapamil) were assayed. Propolis exerted a cytotoxic effect in HEp-2 cells and exhibited an IC₅₀ value of 80 µg/mL, whereas the isolated compounds (alone or in combination) had no effect on cell viability after 72 h. Hence, higher concentrations of these compounds were tested and Caf (IC₅₀: 1.332 µM) induced necrosis in HEp-2 cells, while propolis induced apoptosis, both, probably due to ROS generation. Propolis induced cell cycle arrest at G2/M phase and, Caf at S phase. Propolis or its components, except Caf, can act as a P-gp inhibitor by modulating P-gp activity and inhibiting the efflux of DOX. Altogether, data suggested that propolis exerted cytotoxic effects against HEp-2 cells and some mechanisms are discussed. Its potential as an antitumor drug should be investigated in further assays.

Key words: Propolis; Phenolic compounds; Cytotoxic effect; Hep-2 cells.

1. Câncer: características gerais

Câncer é o termo genérico dado a um conjunto de doenças que apresentam o crescimento desordenado de células que podem vir a invadir tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (1). Um acúmulo de alterações genéticas permite que as células rompam uma série de barreiras proliferativas, conferindo algumas características comuns a todas as células tumorais como: autossuficiência em sinais de crescimento, ausência de resposta a sinais anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (2). As condições para o desenvolvimento tumoral são multifatoriais e podem agir em conjunto ou sequencialmente para promover sua iniciação, quando o organismo está susceptível à instabilidade genética e metabólica (3, 4).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, apresentando uma grande complexidade etiológica e complexas interações entre o tumor e seu microambiente. Além disso, a incidência cresce conforme a longevidade e a adoção de hábitos considerados fatores de risco como consumo de álcool e tabaco, hábitos alimentares, exposição à radiações, etc. (5, 6). Apesar de tantos anos dedicados a estudos para a sua compreensão, o câncer ainda continua sendo uma doença que carece de maiores investigações e terapias eficazes (7).

Linhagens celulares imortalizadas são uma ferramenta valiosa na investigação molecular, bioquímica, genética e imunológica de células derivadas de tecidos neoplásicos, usadas como modelo experimental *in vitro*. O uso destas linhagens mostra-se crível, pois permite avaliar as contribuições funcionais das anormalidades genômicas, visto que a transcrição desregulada presente nos tumores primários humanos é conservada nas linhagens celulares (8).

Diversas células têm sido utilizadas nos estudos de câncer de cabeça e pescoço, como HEP-2, HEP-3 e KB. Em trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, temos utilizado as células da linhagem HEP-2, frequentemente utilizada como modelo de estudos sobre carcinogênese e mutagênese (9-11). Essa linhagem tem uma alta taxa de proliferação e ciclo celular de 23 horas (12). Elas foram descritas inicialmente como sendo derivadas de carcinoma epidermóide da laringe, mas subsequentemente foi encontrado um perfil genético que a identifica como a linhagem celular HeLa, com base em análise de isoenzimas, provavelmente por contaminação com estas células (ATCC® CCL-23™).

Sendo assim, é interessante que haja estudos que promovam uma melhor compreensão das características moleculares que podem prever ou indicar a via de ação de agentes terapêuticos de diferentes tipos de carcinomas, e que possam fornecer subsídios para tratamentos alternativos aos tradicionais quimioterápicos.

2. Produtos naturais e câncer

O uso de plantas medicinais e metabólitos microbianos tem ampliado a expectativa de vida, seja empiricamente ou a partir da síntese de medicamentos de origem natural (13). Nos últimos 25 anos, mais de 75% dos produtos antitumorais foram obtidos de fontes naturais ou sintetizados industrialmente a partir de princípios ativos purificados das mesmas. Dos 140 agentes antitumorais disponíveis desde a década de 40, mais de 60% são oriundos de compostos naturais (14). Esses agentes atuam através de mecanismos que incluem indução de apoptose, clivagem do DNA mediada pela inibição pela topoisomerase I ou II, permeabilização mitocondrial, inibição de enzimas envolvidas na transdução de sinal ou no metabolismo celular, e por inibição da angiogênese (13).

Estudos também têm investigado o efeito da administração de produtos naturais concomitantemente com fármacos (15, 16), a fim de obter uma interação entre ambos por efeito aditivo, sinérgico, antagônico ou potencializador, com o intuito de compreender os efeitos causados pelos agentes antitumorais *in vitro*, para que, futuramente, esta combinação possa ser útil em novos tratamentos, sem interferência na eficiência, diminuindo os efeitos colaterais dos quimioterápicos.

Além de plantas medicinais e metabólitos microbianos, existem também os opoterápicos obtidos a partir de glândulas, órgãos, tecidos ou secreções animais (17). Um exemplo de opoterápico é a própolis produzida por abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Vários autores têm relatado que a própolis e seus componentes representam candidatos promissores para a elaboração de novos fármacos, com efeitos imunomodulador, radioprotetor e principalmente como agentes citotóxicos, antitumoral e quimiopreventivo contra vários tipos de tumores, contribuindo com a expansão do arsenal existente de medicamentos contra o câncer (18-22).

3. Própolis

A própolis é um produto de consistência viscosa, não tóxico, produzido pelas abelhas a partir de resinas e bálsamos exsudados por órgãos vegetais (23, 24). Sua composição varia de acordo com a origem botânica, contendo, geralmente resina, cera, pólen e óleos essenciais e aromáticos (25, 26).

É utilizada pelas abelhas para a construção e manutenção de suas colmeias, sendo empregada para selar aberturas, visando controlar variações de temperatura e a entrada de água. Também é utilizada para embalsamar insetos ou outros invasores que morrem no interior da colmeia, evitando sua decomposição, além de contribuir para manter o ambiente interno asséptico, protegendo-o contra bactérias e vírus (27).

Muitos autores têm relatado os efeitos inibitórios da própolis e de seus compostos químicos sobre o crescimento de células tumorais provenientes de animais ou seres humanos *in vitro* e *in vivo* (18, 21, 28-32). Entretanto, há necessidade de maiores investigações sobre os mecanismos de ação da própolis contra células tumorais. As propriedades biológicas e farmacológicas da própolis estão diretamente ligadas à sua composição química, que varia de acordo com a localização geográfica das plantas utilizadas pelas abelhas. Dentre os componentes principais descritos na composição química da própolis estão os flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres; no entanto, os métodos de análise atualmente disponíveis permitem detectar inúmeros compostos, verificando assim que a variabilidade na composição da própolis é muito elevada, o que justifica suas inúmeras ações terapêuticas, mas dificulta a padronização e comparação dos dados da literatura (33, 34).

A própolis obtida em nosso apiário (UNESP, Campus de Botucatu) foi coletada durante todas as estações do ano, e sua composição foi analisada por cromatografia gasosa (GC), cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia em camada delgada (TLC), revelando que seus principais constituintes são: flavonoides (4'-O-metil canferol, 5,6,7-trihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona, aromadendrina-4'-metil éter), presentes em pequenas quantidades, ácido *p*-cumárico prenilado e dois benzopiranos: *E* e *Z* 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-benzopiranos; óleos essenciais (benzoato de benzila, acetofenonas preniladas, espatulenol, (2*Z*,6*E*)-farnesol); ácidos aromáticos (ácido dihidrocinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido 3,5 diprenil-*p*-cumárico, 2,2-dimetil-6-carboxi-etenil-2H-1-benzo-pirano) (35-37).

Considerando a variabilidade quanto à composição química da própolis, Bankova (2005) (38) relatou que uma padronização universal seria impossível e propôs que os dados obtidos em ensaios biológicos deveriam ser associados à composição química e fontes vegetais da amostra utilizada. Nosso grupo tem realizado ensaios com amostra quimicamente caracterizada e com as fontes vegetais identificadas, sendo *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* e *Eucalyptus citriodora* as principais fontes botânicas em nossa região (35, 39, 40).

4. Ácidos fenólicos

Compostos fenólicos compreendem um dos maiores grupos de metabolitos secundários de plantas, sendo sintetizados em diferentes partes da planta. Eles são formados com funções como de pigmentação, atração de polinizadores, proteção contra patógenos e radiação UV e outros processos de sinalização (41). As substâncias fenólicas embora presentes por todo o reino vegetal, apresentam-se em maior diversidade em plantas superiores, e são muitas vezes encontrado na forma de ésteres, amidas e glicosídeos (42, 43).

Os brotos vegetativos de *B. dracunculifolia* acumulam componentes fenólicos que têm grande importância na coleta realizada pelas abelhas, as quais utilizam as substâncias resinosas dos ápices vegetativos para a elaboração da própolis (44).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonoides (e seus derivados, como as antocianidinas, flavonas, flavonóis, auronas, calconas e isoflavonas); e os ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados).

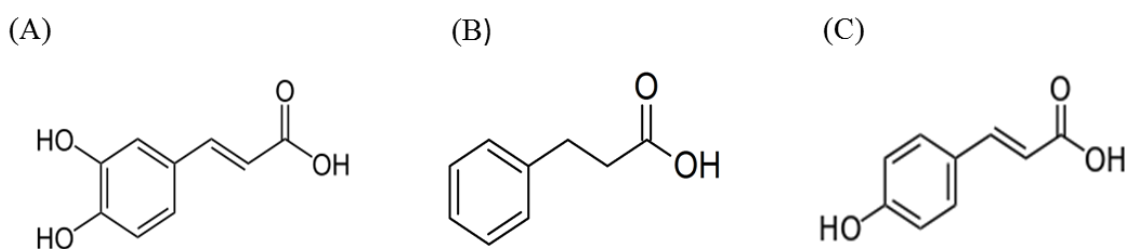
Estudos têm relacionado uma alimentação rica em compostos fenólicos à proteção contra doenças degenerativas, cardiovasculares, diabetes e câncer (45, 46). Atualmente, o interesse nos compostos polifenólicos decorre das observações de suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (47).

Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por C₆-C₃-C₆, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Por sua vez, os ácidos fenólicos são divididos em compostos derivados dos ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁), e em derivados do ácido cinâmico, que possuem nove átomos de carbono (C₆-C₃). Os ácidos fenólicos podem se apresentar em sua forma natural e

também podem se ligar entre si ou com outros compostos. Um exemplo é a combinação entre ácido cafeico e ácido quínico, a qual origina o ácido clorogênico (48).

Dos ácidos fenólicos simples, o ácido cinâmico e seus derivados são amplamente distribuídos nas plantas. Eles são derivados da via do ácido chiquímico através de prenilalanina ou tirosina, e os principais exemplos são o ácido cumárico (grupo hidroxila simples) e ácido cafeico (49). Deste modo, daremos destaque a três ácidos fenólicos presentes na amostra de própolis utilizada em nossos estudos e analisada por CONTI e colaboradores (2013) (36) (Anexo 1): ácido cafeico, presente em quantidade correspondente a 0,297% na própolis; ácido cinâmico (3,04%) e ácido *p*-cumárico (0,382%). Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 1.

Figura 1. Representação das estruturas químicas dos ácidos cafeico (A), dihidrocinâmico (B) e *p*-cumárico (C).



Os ácidos cafeico e *p*-cumárico são derivados do ácido cinâmico, o qual pertence ao grupo das auxinas (hormônios responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular da planta). Seus derivados desempenham importante papel na defesa da planta contra o ataque de insetos e microrganismos (50, 51). Por essas características, esses componentes têm sido estudados para o desenvolvimento de novas drogas (52).

Por possuírem natureza parcialmente lipofílica, se assume que os ácidos fenólicos atravessam a membrana celular e, possivelmente, acidificam o citoplasma, causando desnaturação proteica (53). No que se refere à interação entre os compostos fenólicos e as membranas celulares, sabe-se que, no pH fisiológico, a maioria dos polifenóis interage com os grupos polares de fosfolipídeos presentes na superfície da membrana celular, através das ligações de hidrogênio que envolvem os grupos hidroxila dos polifenóis (54). Em estudo realizado por Castelli e colaboradores (1999) (55), demonstrou-se que o ácido cinâmico consegue atravessar a bicamada lipídica por possuir uma porção hidrofóbica, enquanto que o ácido *p*-cumárico ancora-se apenas em

sua superfície, sem perturbar a estrutura lipídica da membrana, devido às suas características mais hidrofílicas.

Jaganathan et al. (2013) (56) avaliaram o efeito do ácido *p*-cumárico em células HT29 e HCT15 (células de carcinoma de cólon e carcinoma humano coloretal, respectivamente), encontrando valores de IC₅₀ iguais a 1.4 e 1.6 mM, respectivamente. Dois derivados do ácido cinâmico (bacarina e drupanina) exibiram ação citotóxica sobre a linhagem de leucemia mielocítica (HL60), com valores de IC₅₀ iguais a 78.8 e 85.6 µM, respectivamente (57). As propriedades citotóxicas da principal fonte vegetal de própolis em nossa região (*B. dracunculifolia*) podem ser devidas aos flavonóides e ácidos fenólicos (58). Kumazaki et al. (2014) (59) avaliaram a ação antitumoral de 3 derivados do ácido cinâmico (artepilina C, bacarina e drupanina), bem como suas ações em combinação, utilizando a IC₂₀, em linhagens de câncer de cólon (SW480, DLD-1 e 2 linhagens resistentes a drogas). Os compostos induziram apoptose tanto pela via extrínseca como intrínseca quando utilizada a IC₅₀, mas quando utilizada a IC₂₀, não inibiram o crescimento tumoral.

Embora muitos estudos tenham focado na inibição da carcinogênese (tanto *in vivo* quanto *in vitro*) pela dieta rica em polifenóis, os mecanismos de ação e a aplicabilidade destes no combate de câncer é desconhecida.

5. Mecanismos antitumorais da própolis e seus principais componentes

Estudos recentes mostram que a atividade anticâncer da própolis pode ocorrer por efeitos imunomodulatórios ou por bloqueio de genes que controlam vias específicas de sinalização modulando o microambiente do tumor (60-62). Algumas técnicas são utilizadas para estimar essas ações em um sistema *in vitro*, como a analisar o efeito antiproliferativo ou viabilidade (ensaio de MTT), avaliar a citotoxicidade, observando o tipo de morte celular induzida pela própolis, bem como demonstrar se a diminuição da viabilidade celular é alterada pela geração de espécie reativa de oxigênio (ROS) e inferir em que fase ocorre parada do ciclo celular.

5.1. Morte celular

Numa célula, as vias intrínsecas que levam à morte celular programada (63) são cruciais para o desenvolvimento do organismo, para a homeostase tecidual e para a patogênese. Originalmente, o que se conhecia sobre MCP estava relacionado quase que exclusivamente a apoptose. Porém, atualmente sabe-se que outros mecanismos além da apoptose podem estar envolvidos na MCP, como autofagia e necroptose. O entendimento sobre os papéis fisiológicos dos diferentes mecanismos de morte celular e os sinais associados à eles são importantes para, no futuro, tornar possível a manipulação da MCP para fins terapêuticos (64).

Apoptose e necrose se diferenciam por suas características morfológicas. A apoptose é um tipo bem caracterizado de morte celular programada e é considerado como um processo altamente regulado por genes que permitem que uma célula se auto degrade, a fim de eliminar uma célula indesejada ou disfuncional (65).

Tratamentos anticâncer convencionais, tais como a quimioterapia e a radioterapia, matam células de tumor, principalmente, pela indução de apoptose (65, 66). O processo é caracterizado por alterações morfológicas que incluem a condensação da cromatina, do núcleo e do citoplasma, mudança nas propriedades da membrana celular e de organelas seguida de fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, que são posteriormente engolfados por células fagocíticas e digeridos pela ação de enzimas lisossomais (67). Esse processo é regulado por genes pró-apoptóticos (*TP53*, *BAX* e *C-MYC*) ou anti-apoptóticos (*BCL-2*, *BCL-XL*) (68).

Pela ativação de processos enzimáticos ocorre a externalização da fosfatidilserina (FS) pela membrana plasmática (69, 70). A FS é um componente fosfolípido que tem uma forte afinidade de ligação com a anexina-V e é posicionada na superfície interna da membrana celular em células normais. Numa fase inicial de apoptose, a FS é irreversivelmente translocada para fora da membrana celular e liga-se com anexina-V. No sistema *in vitro*, a membrana dos corpos apoptóticos se rompe (também conhecido como necrose secundária) e torna-se também acessível para o corante iodeto de propídio (PI). Portanto, as células necróticas secundárias são coradas por ambas anexina-V e PI (71).

A indução de apoptose é um dos mecanismos propostos para os efeitos terapêuticos anticancerígenos da própolis (65, 72). Akao et al. (2003) (57) descobriram que dois derivados do ácido cinâmico de própolis (baccarina e drupanina) exibiram uma atividade antitumoral *in vitro*, em doses superiores a 30 μ M e que o efeito é devido à

indução de apoptose em células de leucemia (HL60). Jaganathan et al. (56) mostrou por microscopia eletrônica de varredura e fotomicrografia que as células tratadas com ácido *p*-cumárico mostraram formação típica de bolhas e encolhimento na membrana caracterizando apoptose.

As vias (intrínseca e extrínseca) que regulam a apoptose são bem conhecidas, pois há anos vêm sendo foco de investigação, relacionadas ao desenvolvimento de novas modalidades de diagnósticos e terapias no tratamento do câncer. No entanto, apenas recentemente o processo de necrose tem chamado atenção (73).

Diferentemente da apoptose, a necrose é uma forma inflamatória e irreversível de morte celular, muitas vezes referida como morte celular não programada, sugerindo que, dentro de um organismo multicelular, este seja um processo não regulado. Ela provoca a ruptura da membrana plasmática que conduz à liberação do conteúdo intracelular ativando uma rápida resposta inflamatória e amplificação do sinal de danos do sistema imune do hospedeiro (73, 74). Assim, a necrose é vista como uma forma patológica de morte celular que não é um processo fisiologicamente programado. No entanto, um grande número de dados experimentais indica que, muito similar à apoptose, genes específicos evoluíram para regular a morte celular por necrose, indicando que esse tipo de morte celular pode também ser um processo bem regulado, ativado por estímulos fisiológicos e patológicos específicos (73, 75-77). A esse processo regulado, não apoptótico de morte celular, dá-se o nome de necroptose (64). Muitas vezes tratadas como sinônimo, a necroptose é uma forma de morte celular geneticamente regulada de necrose, não devendo, portanto, ser excluída como uma forma possível de morte de células tumorais (78).

5.2. Parada do ciclo celular

Proliferação celular é um processo coordenado onde a progressão pelas fases do ciclo celular é regulada de forma precisa, por estímulos bioquímicos que sinalizam a passagem da célula pelas fases G0/G1, S, G2 e M. Sendo este controle essencial para a manutenção do ritmo de proliferação, para assegurar uma correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos e para coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte (79). Com o mau funcionamento nessas vias, pode ocorrer o aparecimento e perpetuação de mutações e aberrações cromossômicas, levando ao surgimento do câncer (80, 81).

Essas vias respondem inicialmente a fatores extracelulares que fornecem estímulo, por meio de uma cascata de sinalização, para que a célula saia de uma fase do ciclo para a outra. Em G0 a célula se encontra em um estado quiescente, até que haja um estímulo mitótico extracelular que sinaliza a saída para a próxima fase (82). Ao final da fase G1, após o ponto de restrição, o sistema que regula a progressão do ciclo deixa de depender da sinalização extracelular e passa a responder a mecanismos intracelulares que envolvem a ativação sequencial de proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (83).

Vários agentes anti-câncer convencionais têm sido relatados como indutores de parada do ciclo celular nas fases G0/G1, S ou G2/M e, em seguida, induzem a morte celular por apoptose (84, 85). Estudos indicam que compostos naturais, tais como o paclitaxel pode inibir a proliferação celular bloqueando a progressão do ciclo celular em G2/M (86). Silibinina induziu a parada do ciclo celular na fase G1 (87), enquanto xantoxiletina poderia inibir a proliferação de células na fase S (88).

5.3. Influência da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) sobre a viabilidade celular

O estresse oxidativo pode ocorrer como um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante endógena. As ROS são tóxicas, não só para as células normais, mas também para células tumorais. Yang e colaboradores (2013) encontraram que, em células HEP-2, um outro composto natural (silibinina) causou um aumento de viabilidade quando co-tratados com *N*-acetilcisteína (NAC) (89).

Estudos têm mostrado que a própolis possui atividades antioxidantes (23, 90). A maior parte destas atividades biológicas é associada aos flavonóides ou constituintes fenólicos da própolis (18, 23, 91). As ROS podem desempenhar um duplo papel, tanto benéfico quanto deletério, dependendo do nível presente em células vivas (92, 93). Assim, a concentração de própolis utilizada, bem como a composição deste opoterápico pode desencadear diferentes funções em diferentes linhas celulares.

ROS estão envolvidas em várias funções bioquímicas, como proliferação celular e apoptose. Geralmente, o estresse gerado pelas ROS é oncogênico e aumenta a atividade metabólica. Ele também estimula ainda mais a geração de ROS através da cadeia respiratória mitocondrial e mantém o fenótipo de câncer (94, 95).

Por outro lado, a superprodução de ROS pode danificar o DNA, proteínas e membranas lipídicas. A produção excessiva de ROS por quimioterápicos afeta o sistema antioxidante e leva à apoptose das células tumorais (89). Jaganathan e colaboradores (2013) (56) encontraram que o ácido p-cumárico pode ser considerado como um potencial candidato exógeno (gerador de ROS) a induzir a apoptose em células de câncer de cólon. E discutem sobre a propriedade mais notável dos compostos fenólicos, de que eles têm ação antioxidante devido à capacidade dos grupos hidroxila fornecerem átomos de hidrogênio na eliminação de ROS. Portanto, sugere-se que os compostos fenólicos poderiam eliminar as moléculas ROS inibindo a sinalização da MAPK quinase (*mitogen activated protein kinase*), bloqueando o NFκB (*nuclear factor kappaB*) e estimulando o ativador de proteína 1 que eventualmente levam à inibição da proliferação de células tumorais. Embora as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos possam explicar seu mecanismo de inibição das células tumorais, observa-se que, sob certas condições experimentais, os compostos fenólicos apresentem também atividade pró-oxidante (96).

6. Papel da própolis sobre glicoproteína-P (P-gp)

A resistência de células tumorais é um fenômeno complexo que envolve múltiplas proteínas, porém as mais estudadas estão relacionadas a um único fenótipo, o *Multidrug Resistance* (MDR) (97). Este fenótipo MDR foi descoberto na década de 70, estando relacionado à expressão elevada de uma proteína denominada glicoproteína-P (P-gp) (98). O fenômeno de MDR é um caso de resistência adquirida, observada tanto *in vivo* como *in vitro*, com ausência de resposta aos quimioterápicos sendo a principal causa de insucesso no tratamento de câncer. MDR pode estar relacionado a uma série de fatores não totalmente compreendidos, tais como o transporte da droga através da membrana plasmática, alteração nas enzimas-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade em induzir apoptose. Dentre estes, a relação entre os mecanismos de efluxo através da membrana plasmática é bem estabelecida (99).

O transporte da droga está relacionado com a presença de, no mínimo, três bombas que transportam ativamente o quimioterápico para fora da célula (bombas de efluxo) (100). Três proteínas têm como principal função promover a eliminação de vários compostos hidrofóbicos, incluindo a maioria dos quimioterápicos, assim como taxanos, inibidores da topoisomerase e antimetabólitos: a P-gp, a proteína associada ao

MDR 1 (também conhecida como MRP1 ou ABCC1) e a BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) (101).

Neste trabalho daremos ênfase à P-gp. Esta glicoproteína é expressa na membrana celular de quase todos os tecidos em níveis basais, sendo que em tecidos com papel excretor o seu nível de expressão é maior (102, 103). Em tumores, geralmente a expressão da P-gp pode aumentar através da sensibilização induzida por quimioterápicos, causando assim, resistência intrínseca a essas drogas e resultando no insucesso da terapia e progressão da doença (104-106).

O gene *MDR1* está envolvido com o fenômeno de MDR e induz expressão da P-gp, a qual utiliza a energia proveniente da hidrólise do ATP para induzir o efluxo do quimioterápico. A P-gp pode tanto reduzir a absorção de fármacos quanto acelerar sua expulsão das células, impedindo a ação dos fármacos. A expressão diferenciada da P-gp indica que a mesma apresenta um papel de proteção do organismo contra agentes xenobióticos. Assim, a inibição ou indução da P-gp mediante a co-administração de fármacos, alimentos ou constituintes de extratos vegetais pode resultar em interação farmacocinética, causando toxicidade (107).

Estudos têm relatado a eficácia da quimioterapia combinada com inibidores da P-gp na reversão do quadro de resistência (108, 109). Verapamil (VRP) é um bloqueador de canais de cálcio comumente utilizado no tratamento de hipertensão, angina e infarto do miocárdio (110) e tem sido mencionado como agente capaz de reverter a resistência causada pela P-gp (111) sendo, portanto, combinado com drogas anticancerígenas (112, 113).

Além dos inibidores de P-gp, dados demonstram que produtos naturais também podem agir como adjuvante de forma sinérgica com agentes antitumorais causando aumento na sensibilidade de células tumorais (114). Segundo Middleton et al. (2000) (115), é importante encontrar um inibidor da P-gp de origem natural que não possua ações toxicológicas com maior margem de segurança. Os flavonoides podem ser candidatos a isso devido a sua vasta gama de atividades bioquímicas e farmacológicas.

Para avaliar o efluxo de fármaco modulado pela P-gp, utilizamos neste estudo um substrato desta glicoproteína, a doxorubicina (DOX). A DOX é um antibiótico antraciclina, usado no tratamento de diversos tipos de câncer. Este fármaco exerce efeito citotóxico pela interação com a topoisomerase II (116) e produção de espécies reativas de oxigênio (117). Porém em certos tumores a P-gp, por ser uma molécula

transmembrana, pode causar rápido efluxo de droga, diminuindo a citotoxicidade (118, 119).

Takara et al. (2007) (120) encontraram que o extrato de propolis inibiu a função de MDR1 e aumentou a sensibilidades de células resistentes HeLa/TXL ao substrato de MDR1, sugerindo que esses efeitos podem ser causados por componentes presentes na própolis como éster fenetil do ácido cafeico (CAPE).

Diante das observações expostas, o presente projeto foi delineado visando avançar no conhecimento sobre a participação de alguns compostos fenólicos na ação da própolis. Neste trabalho analisamos o efeito citotóxico de uma amostra de própolis previamente caracterizada, com componentes químicos e fontes vegetais conhecidos, bem como de três componentes (ácido cafeico, ácido dihidrocinâmico e ácido *p*-cumárico) em suas respectivas proporções encontrados na amostra, individualmente ou em combinação, sobre células HEP-2. Para tanto, avaliamos o efeito citotóxico pela indução de apoptose ou necrose e pela geração de ROS. Analisamos também a possível atuação da própolis e do ácido cafeico sobre a inibição da P-gp.

Os dados obtidos junto a esta dissertação encontram-se apresentados a seguir junto ao manuscrito intitulado “Cytotoxic activity and modulation of P-glycoprotein by Brazilian propolis and caffeic acid towards HEP-2 cells”, que será submetido à publicação na revista “Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry” após a defesa da dissertação de mestrado.

Material e métodos

1. Obtenção e manutenção das células do carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2)

A linhagem celular de carcinoma de laringe humana (HEp-2) foi obtida pelo Banco de células do Rio de Janeiro, enquanto que a linhagem celular de rim de macaco verde africano (Vero) foi obtida no Laboratório de Virologia, Instituto de Biotecnologia (IBTec, UNESP). Para o descongelamento das células HEp-2, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37°C por 1 a 2 minutos. A suspensão celular livre de micoplasma foi transferida para garrafas de 25 cm² contendo meio completo, constituído de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina), seguido de incubação em estufa de CO₂ a 5%, com umidade de 95% e a 37°C.

Após atingir confluência em torno de 90%, foram realizados repiques, da seguinte forma: a cultura celular foi lavada com meio DMEM para retirada das células mortas, e incubada a 37°C por 2-3 minutos com 1-2 mL de tripsina- EDTA para garrafas de 25 cm² e com 3-4 mL para garrafas de 75 cm². Após obtenção das células descoladas, foi adicionado meio DMEM completo (MC) e as garrafas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. A concentração celular foi atingida utilizando o corante Azul de Trypan e câmara de Neubauer, ajustando-a para 2 x 10⁵ células/mL, adicionando 100 µL em cada poço de placa de microcultura. O tempo de incubação para aderência das células, antes de adicionar os tratamentos, foi de 24 horas.

2. Preparo das variáveis

2.1. Própolis:

A própolis bruta produzida por abelhas africanizadas foi coletada no apiário da Fazenda Lageado (UNESP, campus Botucatu/SP) e congelada a -20°C. Foi preparado o extrato da amostra em etanol 70% em ausência de luz, em temperatura ambiente e agitação moderada. Após uma semana, o extrato foi filtrado e o peso seco calculado (110 mg/mL). Os principais componentes encontrados na amostra de própolis foram previamente investigados por CG-MS (36).

Do extrato de própolis na concentração de 110 mg/mL foram pipetados 4,55 µL de própolis completando com 2495,5 µL de MC, resultando em 2,5 mL de solução mãe

de própolis, na concentração de 200 µg/mL. Foram preparadas várias concentrações (25, 50, 100 e 120 µg/mL) para encontrar a concentração inibitória média (valor de IC₅₀) a partir do extrato hidroalcoólico de própolis.

2.2. Ácidos fenólicos:

Os compostos fenólicos isolados foram cedidos gentilmente pelo Prof. Titular Jairo Kenupp Bastos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, e utilizados nas seguintes proporções encontradas na amostra de própolis: ácido cafeico (Caf: 0,297%), ácido dihidrocinâmico (Cin: 3,040%) e ácido *p*-cumárico (Cou: 0,382%) (36). Os compostos foram diluídos (100 mg/mL m:v, etanol 70%) com MC. Os ácidos foram testados individualmente, em combinação dois a dois e os três conjuntamente, da seguinte forma:

C1: Caf + Cin

C2: Caf + Cou

C3: Cin + Cou

C4: Caf + Cin + Cou

2.3. Etanol 70%:

Foi preparada uma solução mãe de etanol 70%, para avaliar o efeito deste solvente da própolis, presente na maior concentração utilizada de própolis (120 µg/mL) com relação às células HEp-2.

3. Viabilidade celular pelo método de MTT

Após 24, 48 e 72 horas de incubação das células em placa de 96 poços com os respectivos estímulos, o sobrenadante das culturas foi descartado e foram adicionados 100 µL de solução com brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que mede a habilidade das células viáveis em reduzir o sal tetrazólio solúvel (coloração amarela) a cristais de formazan insolúveis de coloração púrpura, após 3 horas de incubação. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 100 µL de DMSO para que ocorresse a lise das células e a solubilização dos cristais, permitindo assim a leitura da densidade óptica de cada poço, através do leitor de ELISA, utilizando o filtro de 540 nm.

Com os valores da densidade óptica (A₅₄₀), a média das triplicatas dos poços controle foi considerada como sendo 100% de viabilidade celular, e a média das

triplicatas de cada concentração das variáveis foi comparada com a média do controle do mesmo período de tempo, em porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \text{A540 de células tratadas} / \text{A540 do controle de células} \times 100\%$$

4. Seletividade da própolis sobre células não tumorais (Vero)

Para determinar se nossa amostra de própolis e seus componentes atuavam de forma seletiva sobre as células tumorais, foi avaliada a viabilidade da linhagem não tumoral de células renais de macaco verde africano (Vero), pelo método do MTT.

As células Vero foram descongeladas e cultivadas da mesma forma como citado anteriormente para a linhagem HEP-2.

5. Avaliação de apoptose e necrose

Para avaliar se o tipo de morte celular causado pela própolis e os três compostos isolados (Caf, Cin e Cou) era devido à indução de apoptose ou necrose, foi realizado o teste com o kit de detecção de apoptose com anexina V-FITC (AV) e iodeto de propídio (PI) (Becton Dickinson, USA) por citometria de fluxo.

Células HEP-2 foram cultivadas (2.0×10^5 cells/mL) em placas de 24 poços, deixadas para aderência por 24 h e tratadas com a IC_{50} da própolis e dos compostos fenólicos por 72 h. Foi utilizado um grupo de células como controle negativo, sem adição dos produtos naturais. Após o tratamento, foi realizada a tripsinização das células para total descolamento da placa e o conteúdo centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4 por duas vezes. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado com tampão de anexina e foram adicionados 1 μ L de solução de PI e, logo após, colocado 3 μ L de AV por tubo, ficando em ausência de luz por 15 minutos.

As variáveis foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, USA) com filtros de emissão de 515-545 nm para FITC (verde) e 600 nm para PI (vermelho) utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences) e analisado pelo software FlowJo vX 10.6 (Tree Stars Inc.). Foram identificadas pelo sistema dot plot (quatro quadrantes) as células vivas (AV-, PI-), as marcadas em apoptose inicial (AV+, PI-), as células em necrose (AV-, PI+) e as com dupla marcação (apoptose tardia ou necrose, AV+, PI+).

6. Parada do ciclo celular

Também por citometria de fluxo, foi observada a fase do ciclo celular em que a própolis e os compostos fenólicos estudados estariam induzindo parada.

A linhagem HEP-2 foi cultivada e tratada da mesma forma realizada para análise de morte celular. Após 72 h, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O pellet então foi ressuspensionado e fixado sob agitação com etanol (70%) a 4 °C e mantidos em freezer por 1 h. Após a fixação, os tubos foram centrifugados, lavados com 2 mL de PBS-BSA (0,5%) e centrifugados novamente. Então, as células fixadas foram marcadas com solução de PI (1 mg/mL) e 3 µL de RNase A (100 mg/mL), para o volume final de 400 µL, por 1 h a 37°C.

A porcentagem de células nas fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M foram determinadas utilizando o mesmo aparelho e software usados para análise de morte celular.

7. Influência da geração de espécies reativas de oxigênio sobre a viabilidade celular

Para determinar se o possível efeito citotóxico sobre a viabilidade celular da própolis e seus componentes seria pela geração de espécies reativas de oxigênio, foi realizado o co-tratamento com um agente antioxidante. Neste ensaio, foi determinada a porcentagem de viabilidade celular mediante o ensaio de MTT descrito anteriormente, utilizando a NAC como agente antioxidante.

O preparo das variáveis foi realizado conforme descrito a seguir:

NAC: Foi preparada uma solução-mãe de NAC a 100 mM, pesando-se 16,3 mg/mL de MC (massa molar: 163,19 g/mol).

NAC + Própolis: Foram adicionados 50 µL de NAC (5 mM) e 50 µL de própolis na IC₅₀, por poço.

8. Tratamento de células HEP-2 com própolis em combinação com inibidor de P-gp

A sensibilidade de células HEP-2 à DOX associada ao inibidor de P-gp (cloridrato de verapamil - VRP) e própolis foi determinada por ensaio de MTT. O VRP foi dissolvido em etanol 70% e, para atingir a concentração final de 5 mM, foi

adicionado meio completo. Células HEp-2 (2×10^5 cells/mL) foram então tratadas com DOX (0.1, 1, 10 e 100 mM) sozinha ou em combinação com VRP e própolis (IC₅₀).

Células incubadas somente com meio completo foram utilizadas como controle e os ensaios realizados em triplicata. O efeito citotóxico de cada tratamento com DOX foi expresso pelo valor de IC₅₀.

O preparo das variáveis foi realizado conforme descrito a seguir:

VRP: Foi preparada uma solução mãe do inibidor da P-gp, a 100 µM, dissolvendo-se 1 mg de VRP em 20 mL de etanol 70% e adicionado MC para atingir a concentração 5 µM, utilizada nos ensaios.

DOX: Foi diluído 1 mg deste agente em 1 mL de MC. A partir da sua massa molar (543,46 g/mol), foi preparada a solução mãe de DOX, com concentração de 1840 µM. Logo após foram preparadas as concentrações de 0.1, 1, 10 e 100 mM para incubação com as células.

9. Análise estatística

Os valores de IC₅₀ foram determinados pela interpolação do gráfico da concentração de própolis e compostos fenólicos *versus* a viabilidade celular. A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnet para comparações com o controle, e o teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados e discussão

1. Viabilidade celular

Para avaliar o efeito sobre a viabilidade celular da linhagem HEP-2 pelo método de MTT, as células foram tratadas com o extrato de própolis (25, 50, 100 e 120 µg/mL) e os compostos isolados sozinhos ou em combinação (C): Caf (0.297%), Cin (3.040%), Cou (0.382%), C1 = (Caf/Cin: 0.297/3.040%), C2 = (Caf/Cou: 0.297/0.382%), C3 = (Cin/Cou: 3.040/0.382%), C4 = (Caf/Cin/Cou: 0.297/3.040/0.382%) por 24, 48 e 72 h.

A própolis apresentou inibição de maneira dose e tempo-dependente sobre o crescimento das células HEP-2 (Figura 1). Os valores de IC₅₀ da própolis, após 24, 48 e 72 h foram 218.5, 160.3 e 80.1 µg/mL, respectivamente. Desta forma, escolhemos a concentração 80 µg/mL em 72 h para os seguintes ensaios. Além disso, a própolis não afetou a viabilidade celular da linhagem não neoplásica Vero. O valor de IC₅₀ obtido de três experimentos independentes, após 72 h, foi 116.3 µg/mL, indicando que a própolis atuou de maneira seletiva para células tumorais (HEP-2) em comparação com a não tumoral (Vero).

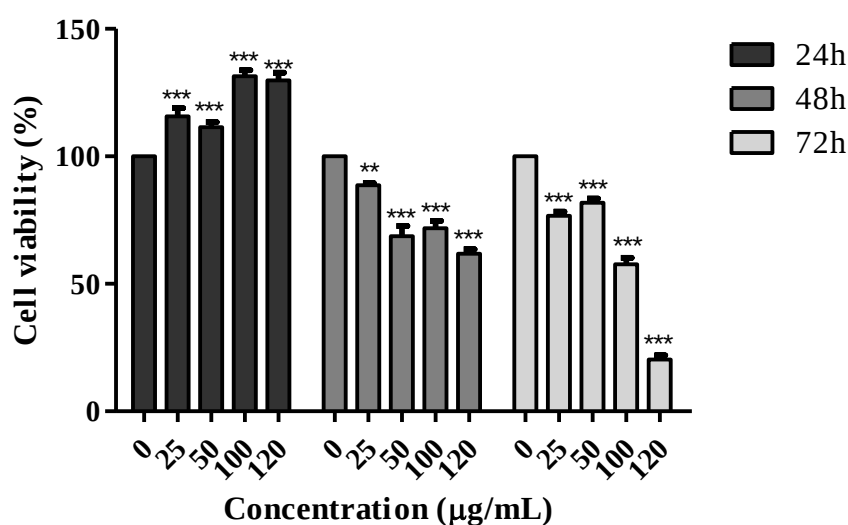


Figura 1. Viabilidade celular (%) das células HEP-2 expostas a diferentes concentrações de própolis (25, 50, 100 e 120 µg/mL) por 24, 48 e 72 h. Valores representam a média de três experimentos independentes $\pm$ o desvio padrão (SD), em comparação ao controle no mesmo período de tempo. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Os componentes fenólicos isolados sozinhos ou em combinação, utilizados nas concentrações correspondentes às porcentagens de cada composto na amostra de própolis (IC₅₀) não afetaram a viabilidade celular de HEP-2, após 72 h (Figura 2a). As concentrações de ácidos fenólicos correspondentes em µM são: Caf: 1.332 µM; Cin: 16.378 µM; Cou: 1.888 µM.

Sendo assim, propusemos avaliar concentrações dos ácidos fenólicos maiores do que aquelas encontradas na própolis. Para isso, as seguintes concentrações foram escolhidas: 0.4, 0.8, 1.6 e 3.2 mM, por 72 h. Foi observada uma diminuição da viabilidade celular de forma dose-dependente em comparação com células não tratadas (Figure 2b). Caf apresentou um maior efeito citotóxico em comparação ao Cin e Cou. Os valores de IC_{50} para cada composto foram: Caf: 1.355 mM; Cin: 6.032 mM e Cou: 3.425 mM.

O etanol 70%, utilizado como solvente, não apresentou efeito tanto na morfologia celular quanto na viabilidade celular (dados não mostrados), sugerindo que os efeitos citotóxicos são devidos exclusivamente à própolis e seus componentes.

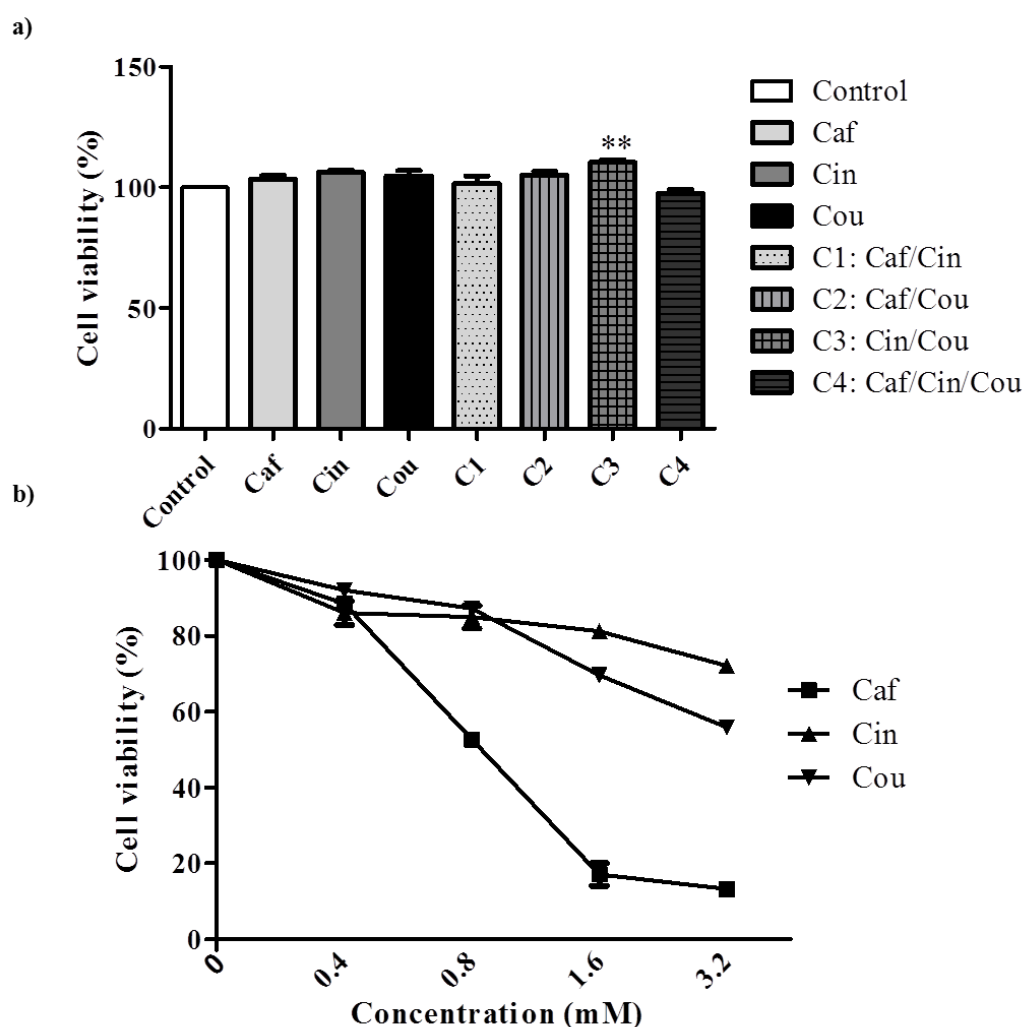


Figure 2. a) Viabilidade celular (%) das células HEP-2 expostas aos ácidos Caf, Cin e Cou sozinhos ou em combinação (C), nas concentrações correspondentes às porcentagens relativas de cada composto na própolis (IC_{50}) por 72 h. **b)** Efeito dos ácidos fenólicos, em maiores concentrações (0.4, 0.8, 1.6 e 3.2 mM) sobre a viabilidade de células HEP-2 após 72 h. Valores representam a média de três experimentos independentes $\pm$ SD.

Os resultados mostraram que a própolis diminuiu a viabilidade celular de HEP-2 de maneira dose e tempo-dependente, com maior efeito contra essa linhagem tumoral em relação à não tumoral analisada (células Vero). Em contrapartida, os compostos fenólicos tanto sozinhos como em combinação, nas proporções encontradas na amostra de própolis não afetaram a viabilidade de células HEP-2. Apenas quando testados em concentrações maiores, os ácidos fenólicos se mostraram efetivos na diminuição da viabilidade celular, após 72 h. Particularmente Caf exibiu maior efeito antiproliferativo em comparação ao Cin e Cou.

A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com a fonte vegetal (121). A amostra de própolis analisada contém ácido benzoico, Cin, Cou, flavonóides, flavonas, triterpenos e artepilina C (36). Diversos estudos utilizando componentes químicos isolados da própolis demonstram diversas respostas biológicas, entre elas a atividade anti-tumoral (122, 123). Os compostos Caf (124, 125), Cin (57, 59), Cou (56, 126) e artepilina C (28, 127), apresentam efeito anti-tumoral dependendo da concentração utilizada. O efeito antiproliferativo da amostra de própolis utilizada neste estudo poderia ser explicado pela presença de artepilina C – um dos compostos majoritários de nossa amostra – bem como pelo possível efeito sinérgico entre os componentes da própolis, o que sugere que esta amostra poderia ser uma fonte promissora de componentes bioativos para o tratamento de câncer de laringe.

Kumazaki et al. (2014) (59) examinaram o mecanismo da atividade anti-câncer de 3 derivados do ácido cinâmico da própolis (artepilina C, bacarina e drupanina) e seus efeitos em combinação (cada um na sua concentração IC_{20}) em linhagens de câncer de cólon humano (SW480, DLD-1 e 2 linhagens resistentes à droga). Eles demonstraram que esses componentes induziram efeito citotóxico quando testados nas concentrações IC_{50} , porém quando testados sozinhos em suas IC_{20} , eles não apresentaram inibição significativa do crescimento celular. Entretanto, a combinação 2 a 2 dos compostos isolados resultou em uma supressão significativa da proliferação celular, indicando sinergismo entre eles, cujo efeito foi devido à ativação da caspase-8. Especialmente, o tratamento combinado com bacarina e drupanina demonstrou o efeito mais significativo de indução de apoptose por ativação de ambas as vias de sinalização da apoptose.

2. Análise do tipo de morte celular por citometria de fluxo

Para determinar se a ação inibitória da própolis (IC_{50}) e do Caf (IC_{50}), sobre as células HEP-2, acontece pela indução de apoptose ou necrose, foi realizada uma dupla marcação com anexina V-FITC/PI para análise em citômetro de fluxo.

O tratamento das células com própolis, durante 72 h, aumentou a porcentagem de células em apoptose ($AV+$, $PI-$) (8.03%) quando comparadas ao tratamento com Caf (3.02%) e ao controle de células não tratadas (4.22%). Já o tratamento com Caf induziu aumento do número de células em apoptose tardia ou necrose ($AV+$, $PI+$), demonstrado pela porcentagem de 36.2% comparada com o controle (3.04%) e o tratamento com própolis (5.92%) (Figura 3).

Nossos resultados estão de acordo com investigações anteriores mostrando que a própolis verde brasileira inibiu diferentes linhagens tumorais através da indução de apoptose (114-116)

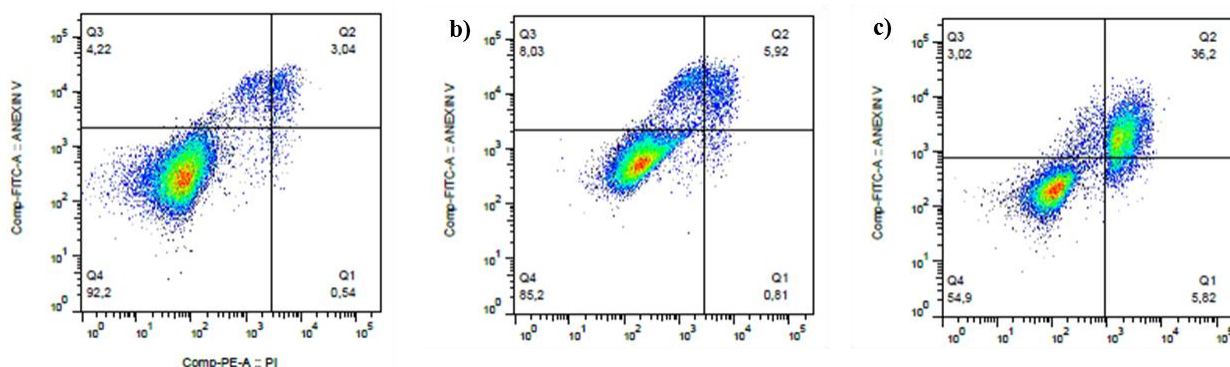


Figura 3. Avaliação da indução de apoptose/necrose em células HEP-2 por citometria de fluxo, com marcação por anexina V/PI. Os gráficos mostram (a) controle; (b) própolis (80 μ g/mL) e (c) Caf (1.355 mM), demonstrando a porcentagem de células em apoptose inicial ($AV+$), células em apoptose tardia ou necrose ($AV+/PI+$ ou $PI+$). Q1 representa células em necrose; Q2 representa células em apoptose tardia ou necrose; Q3 representa células em apoptose; Q4 representa células vivas.

3. Influência da própolis e seus componentes fenólicos isolados na parada do ciclo celular de HEP-2

A interferência na progressão do ciclo celular é uma importante análise para a decisão da estratégia de tratamento contra o câncer a se adotar. Para determinar se tanto o tratamento com própolis como com Caf, em seus respectivos valores de IC_{50} , após 72 h, estariam afetando o ciclo celular de HEP-2, foi realizada a marcação com PI em ensaio analisado por citometria de fluxo.

O tratamento com própolis aumentou a população celular (32.0%) em fase G2/M do ciclo, em comparação com o controle (18.7%). Não foram encontradas diferenças nas fases G0/G1 e S para esse tratamento. Já o Caf diminuiu a população de células em fase G0/G1 (38.2%) quando comparadas com o controle (50.6%), e aumentou o número de células em fase S (16.5% vs. 10.3% do controle) (Figura 4).

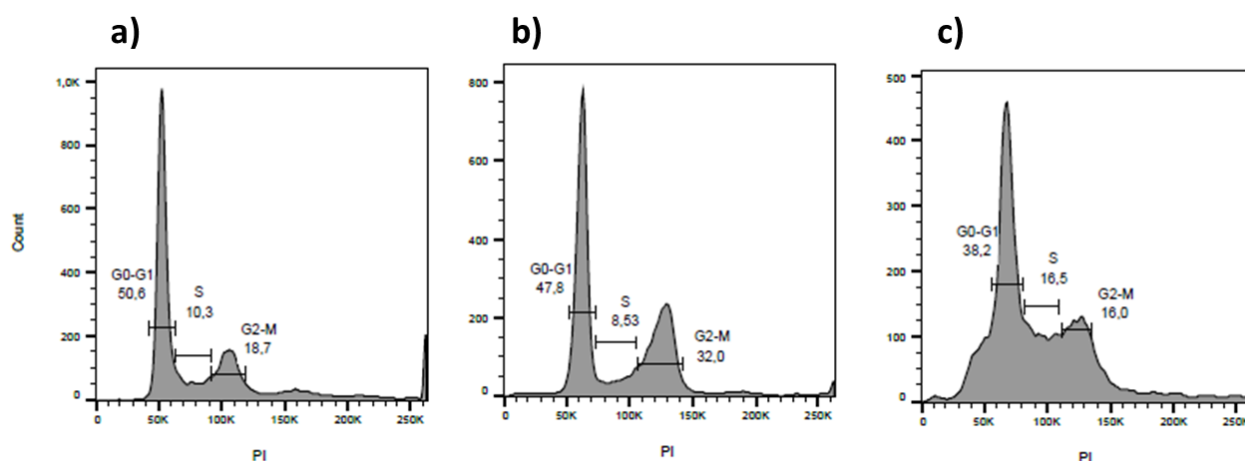


Figura 4. Análise por citometria de fluxo de células HEP-2 incubadas por 72 h na presença de (a) meio completo (controle); (b) própolis (80 µg/mL) e (c) Caf (1.355 mM), marcadas com PI. Cada histograma indica a porcentagem de células nas fases dos ciclos G0/G1, S, e G2/M.

Sabe-se que a apoptose e a parada do ciclo celular são eventos intimamente relacionados. A interrupção da progressão do ciclo celular pode conduzir tanto à morte apoptótica como necrótica (128), o que sugere que ambos os tipos de morte celular podem ser úteis na terapia do câncer (129).

Vários estudos têm demonstrado o efeito anticarcinogênico do CAPE (122, 130, 131), mas pouco se sabe sobre os efeitos do Caf. CAPE e Caf são moléculas com diferentes propriedades físicas, químicas e funcionais (132). Estudos demonstraram que CAPE inibiu a proliferação de várias linhagens tumorais humanas, incluindo estudos *in vitro* com câncer de cabeça e pescoço, induzindo apoptose e interrupção do ciclo celular (G1 ou G2 / M) (130, 133-138), enquanto que, em nosso estudo, Caf induziu necrose. Tais diferenças são provavelmente devido à estrutura de cada molécula. Além disso, o potencial apoptótico de nossa amostra de própolis pode ser determinado pela ação conjunta de diferentes componentes dela.

4. N-acetilcisteína diminui o efeito citotóxico da própolis e Caf em células HEp-2

Para investigar se a morte celular induzida pela própolis e pelo Caf é devido principalmente à ROS, foi realizado o co-tratamento das células HEp-2 com o antioxidante NAC (5mM) e própolis (IC₅₀) por 72 h, e da mesma forma foi realizado com o Caf (IC₅₀).

O co-tratamento de NAC+própolis aumentou a viabilidade celular de 68.40% para 79.2% (figura 5). Enquanto que o co-tratamento de NAC+Caf causou diminuição do efeito citotóxico deste composto de 23,13% para 95,75% (figura 6)

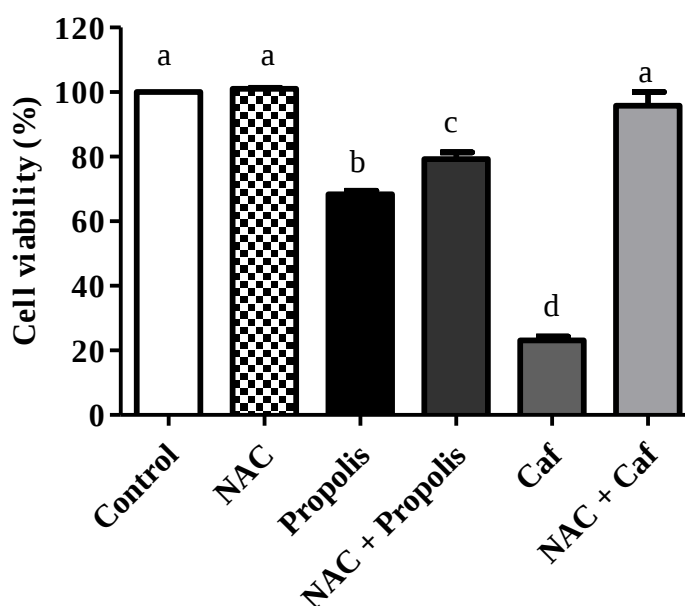


Figura 5. Viabilidade celular de HEp-2 incubada com própolis e Caf com ou sem NAC (5 mM). A porcentagem (%) de viabilidade celular foi avaliada por MTT após 72 h, comparando os tratamentos com e sem NAC. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0.05$).

Estudos recentes indicam que altos níveis de ROS podem causar apoptose ou necrose por diferentes mecanismos em células tumorais (96, 139-141). Em nosso estudo, tanto a própolis como o Caf diminuíram significativamente a viabilidade de células HEp-2 e NAC foi capaz de bloquear efetivamente a geração de ROS induzida por esses tratamentos, reestabelecendo assim, a viabilidade celular. Estes resultados indicam que o estresse oxidativo é um possível mecanismo envolvido na indução de apoptose e necrose pela própolis e pelo Caf, respectivamente, em células HEp-2. Caf é um dos principais componentes da amostra de própolis utilizada, representando 0.297%. Dessa forma, as diferenças no tipo de morte celular induzidas pelo estresse oxidativo

podem ser explicadas pela composição da própolis, pelo fenótipo da célula e pelas condições experimentais (142, 143).

5. Modulação do efeito citotóxico de DOX pela inibição da atividade da P-gp em células HEP-2

Células HEP-2 expostas ao VRP e própolis por 72 h exibiram uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração de DOX (Figura 7). Houve diferenças significativas entre os tratamentos VRP/DOX, própolis/DOX e VRP/própolis/DOX em comparação com as células tratadas somente com DOX (Tabela 1). Níveis similares de citotoxicidade foram encontrados entre VRP/DOX, própolis/DOX e VRP/própolis/DOX, indicando que VRP e própolis ou alguns de seus componentes provavelmente se ligam à P-gp e inibem, de forma competitiva, a junção ou transporte de DOX, substrato da P-gp.

DOX é uma droga comumente utilizada no tratamento quimioterápico contra vários tipos de tumores. Seu mecanismo molecular consiste na intercalação do DNA e inibição da atividade enzimática da topoisomerase II. Contudo, seu uso clínico é limitado pela indução de cardiotoxicidade pela geração de ROS (144, 145). Estudos têm mostrado que diferentes linhagens tumorais apresentam resistência à DOX, devido ao efluxo de droga mediado pela P-gp (146, 147). Desta forma, há uma necessidade de introdução de novos tratamentos anti-câncer para este tipo de célula resistente.

Interessantemente, nossos achados mostraram que a incubação de células HEP-2 com DOX/VRP, DOX/propolis, VRP/DOX/propolis, DOX/Caf reduziram a viabilidade celular comparada ao tratamento com DOX sozinha. DOX em combinação com VRP ou própolis foi capaz de entrar nas células HEP-2 mais eficientemente do que a DOX sozinha, ao contrário do tratamento de VRP/DOX/Caf.

VRP é um bloqueador dos canais de cálcio e recentemente tem sido associado à reversão da resistência causada pela P-gp *in vitro* (148). Com nossos resultados, podemos sugerir que o bloqueio do canal da P-gp em células HEP-2 seria um possível mecanismo induzido pela própolis ou seus componentes, com exceção de Caf, em associação com DOX. Estes dados estão de acordo com outros trabalhos, mostrando mecanismos similares desencadeados por uma amostra de própolis diferente, inibindo a função do gene MDR1 (P-gp) e aumentando a sensibilidade ao taxol em células HeLa (120).

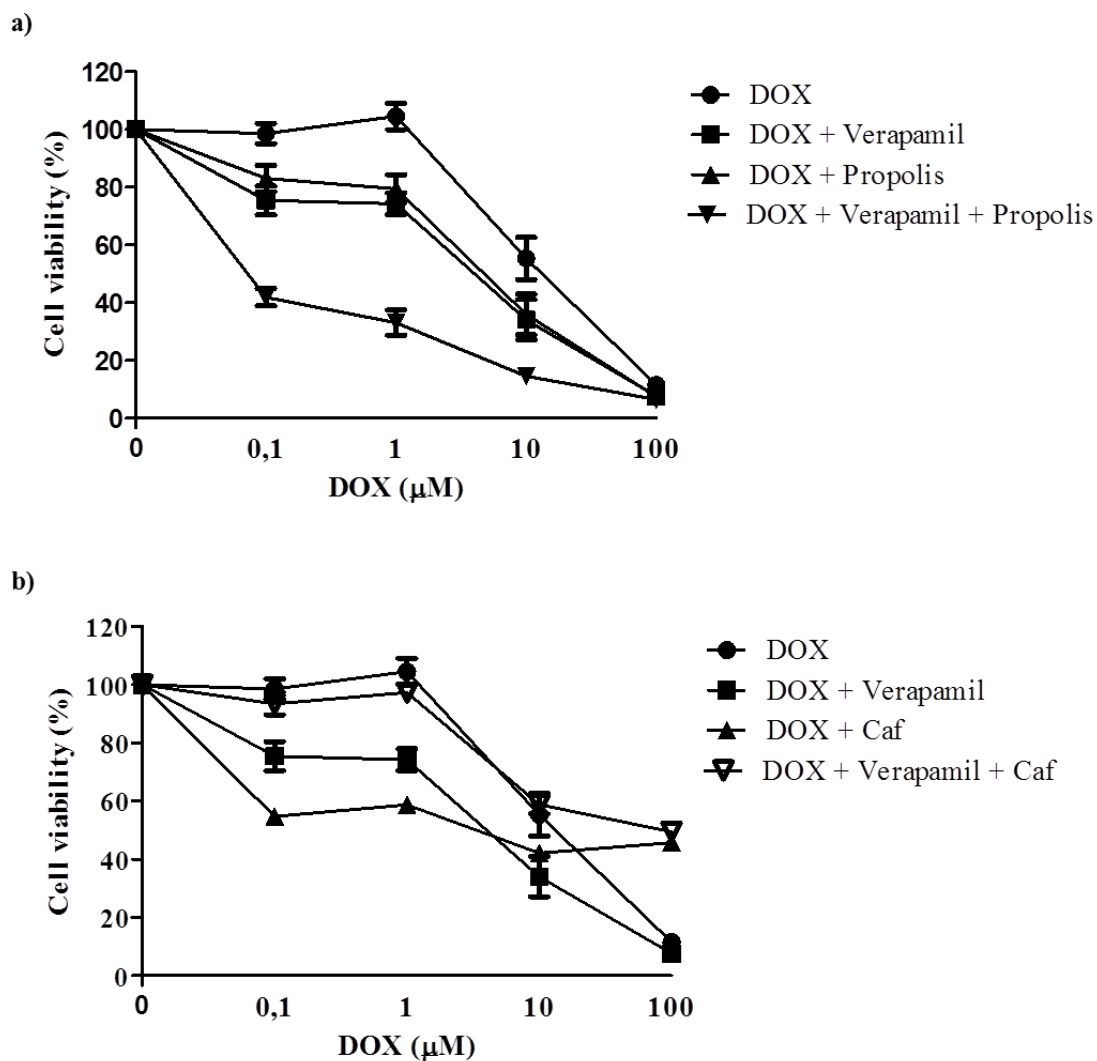


Figura 6. Efeito do inibidor de P-gp (VRP) e própolis na citotoxicidade induzida por DOX sobre células HEP2. A viabilidade celular foi avaliada por MTT. Células viáveis estão indicadas pelas porcentagens de absorbância. **a)** Os efeitos de VRP/DOX, própolis/DOX, VRP/própolis/DOX e DOX foram determinados. **b)** Os efeitos de VRP/DOX, Caf/DOX, VRP/Caf/DOX e DOX foram determinados. Valores representam a média de três experimentos independentes $\pm$ SD.

Tabela 1. Efeito citotóxico de própolis e VRP simultaneamente com DOX.

Treatment	IC ₅₀
DOX	56.60 $\pm$ 17.97 ^a
DOX + VRP	37.88 $\pm$ 16.50 ^b
DOX + Propolis	35.89 $\pm$ 17.09 ^b
DOX + Propolis + VRP	28.30 $\pm$ 16.46 ^b

Valores representam a média de três experimentos independentes $\pm$ SD dos valores de IC₅₀.
 Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 2. Efeito citotóxico de Caf e VRP simultaneamente com DOX.

Treatment	IC₅₀
DOX	56.60 ± 17.97 ^a
DOX + VRP	37.88 ± 16.50 ^b
DOX + Caf	67.11 ± 10.56 ^c
DOX+ Caf + VRP	>100

Valores representam a média de três experimentos independentes ± SD dos valores de IC₅₀.

Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos (p < 0.05).

Conclusão

Esta amostra de própolis inibiu o crescimento de células HEP-2 e induziu apoptose mediada pela produção de ROS. Os compostos fenólicos isolados (Caf, Cin e Cou) em concentrações encontradas na amostra de própolis não afetou a viabilidade celular, no entanto, maiores concentrações exerceram efeitos citotóxicos significativos. Particularmente, Caf exibiu uma atividade citotóxica maior do que Cin e Cou, induzindo necrose das células HEP-2. Além disso, a própolis foi capaz de modular a sensibilidade de células HEP-2 à DOX por inibição da atividade de P-gp. São necessárias maiores investigações para elucidar o envolvimento de própolis contra células tumorais.

ANEXO 1:

TABLE 1: Relative percentages of compounds, determined by GC-MS, from ethanolic extract of Brazilian propolis.

Component	Retention time (min)	% of total
Benzoic acid	9.3	0.193
Dihydrocinnamic acid	14	2.180
Dihydrocinnamic acid	22	0.860
Coumaric acid	26.5	0.382
Cafeic acid	28.6	0.297
Prenyl- <i>p</i> -coumaric acid	32.5	6.560
Flavonoids	35.8	1.142
Artepillin C	37.7	16.750
Trihydroxymethoxy flavonon	40.5	0.666
Tetrahydroxy flavonon	40.8	0.228
Triterpene	47.6	0.777
Triterpene	51	0.309

Retirado de: Conti BJ, Bufalo MC, Golim Mde A, Bankova V, Sforcin JM. Cinnamic Acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM. 2013;2013:109864. Epub 2013/06/14.

Referências:

1. INCA INDCJDAGDS. O que é câncer. 2016 [cited 2016]; Available from: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322.
2. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*. 2012;13(6):607-15. Epub 2012/05/12.
4. Global action plan for the prevention and control of NCDs 2013-2020. [database on the Internet]. 2014.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(1):11-30. Epub 2013/01/22.
6. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108. Epub 2015/02/06.
7. Sonnenschein C, Soto AM, Rangarajan A, Kulkarni P. Competing views on cancer. *Journal of biosciences*. 2014;39(2):281-302. Epub 2014/04/17.
8. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*. 2006;10(6):515-27. Epub 2006/12/13.
9. Grem JL, Fischer PH. Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyrindamole. *Pharmacol Ther*. 1989;40(3):349-71. Epub 1989/01/01.
10. Sinico RA, Bollini B, Sabadini E, Di Toma L, Radice A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *Journal of nephrology*. 2002;15 Suppl 6:S20-7. Epub 2003/01/08.
11. Valdovinos MR, Gomez B. Establishment of respiratory syncytial virus persistence in cell lines: association with defective interfering particles. *Intervirology*. 2003;46(3):190-8. Epub 2003/07/18.
12. Den Beste HE, Fjelde A, Jackson JL, Andresen WF, Kerr HA, Evans VJ. Adaptation, growth, and chromosomal analysis of HEp-2 cells in chemically defined medium. *Journal of the National Cancer Institute*. 1966;36(6):1075-88. Epub 1966/06/01.
13. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol*. 2011;4:687.
14. Cragg GM, Newman DJ. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert opinion on investigational drugs*. 2000;9(12):2783-97. Epub 2000/11/28.
15. Ambroz M, Hanusova V, Skarka A, Bousova I, Kralova V, Langhasova L, et al. Essential Oil from *Myrica rubra* Leaves Potentiated Antiproliferative and Prooxidative Effect of Doxorubicin and its Accumulation in Intestinal Cancer Cells. *Planta medica*. 2016;82(1-02):89-96. Epub 2015/10/21.
16. Surmeli Z, Gursoy P, Erdogan AP, Bozkurt E, Atmaca H, Uzunoglu S, et al. Combination of zoledronic acid and serine/threonine phosphatase inhibitors induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cells via inhibition of PI3K/Akt pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015. Epub 2015/10/16.
17. [Internet] ANdVS. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos - CATEF. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm.2016> [cited 2016]; Available from: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>.
18. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. 2001;15(7):561-71.
19. Frión-Herrera Y, Díaz-García A, Ruiz-Fuentes J, Rodríguez-Sánchez H, Sforcin JM. Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015;67(10):1448-56.

20. Oršolić N. A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *Journal of Api Product and ApiMedical Science* 2010;2 (1):1 - 20
21. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of ethnopharmacology*. 2011;133(2):253-60. Epub 2010/10/26.
22. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2011;63(11):1378-86. Epub 2011/10/13.
23. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1998;36(4):347-63. Epub 1998/07/03.
24. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73 Suppl 1:S1-6. Epub 2002/12/24.
25. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18:447-54.
26. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;113(1):1-14. Epub 2007/06/21.
27. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2005;2(1):33-8. Epub 2005/04/21.
28. Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artemisinic acid inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer letters*. 2007;252(2):235-43. Epub 2007/03/09.
29. Aso K, Kanno S, Tadano T, Satoh S, Ishikawa M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2004;27(5):727-30. Epub 2004/05/11.
30. Orsolic N, Basic I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2005;59(10):561-70. Epub 2005/10/06.
31. Oršolić N, Bašić I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;102(1):37-45.
32. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Niklinski J. The anticancer activity of propolis. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2012;50(1):25-37. Epub 2012/04/26.
33. Kartal M, Kaya S, Kurucu S. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences*. 2002;57(9-10):905-9. Epub 2002/11/21.
34. Krell R. VALUE-ADDED PRODUCTS FROM BEEKEEPING. *Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome*
- FAO AGRICULTURAL SERVICES BULLETIN 1996.
35. Bankova Vea, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. . Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*. 1998b;29:361-6.
36. Conti BJ, Bufalo MC, Golim Mde A, Bankova V, Sforcin JM. Cinnamic Acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013;2013:109864. Epub 2013/06/14.
37. G. Boudourova-Krasteva, Vassya Bankova, J. M. Sforcin, Nikolova N, Popov S. Phenolics from Brazilian Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*. 1997;52c: 676-9.
38. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):114-7. Epub 2005/07/05.
39. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao

- Paulo state. Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences. 1999;54(5-6):401-5. Epub 1999/08/04.
40. Conti BJ, Bankova V, Sforcin JM. Chemical Composition of the Same Brazilian Propolis Sample Analyzed in 1997 and in 2012: No Freezing Effect. Natural product communications. 2015;10(7):1279-80. Epub 2015/09/29.
 41. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chem Int Ed Engl. 2011;50(3):586-621. Epub 2011/01/13.
 42. Boudet AM. Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry. 2007;68(22-24):2722-35. Epub 2007/07/24.
 43. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale. 2013;72:1-20. Epub 2013/06/19.
 44. de Sousa JP, da Silva Filho AA, Bueno PC, Gregorio LE, Furtado NA, Jorge RF, et al. A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. Phytochemical analysis : PCA. 2009;20(1):24-32. Epub 2008/08/30.
 45. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. The American journal of clinical nutrition. 2005;81(1 Suppl):317S-25S. Epub 2005/01/11.
 46. Gonzalez S, Fernandez M, Cuervo A, Lasheras C. Dietary intake of polyphenols and major food sources in an institutionalised elderly population. Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association. 2014;27(2):176-83. Epub 2013/03/26.
 47. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annual review of nutrition. 2001;21:381-406. Epub 2001/05/26.
 48. SOARES SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Revista de Nutrição. 2002;15(1):71-81.
 49. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. Annals of the New York Academy of Sciences. 1998;854:435-42. Epub 1999/02/03.
 50. Licandro-Seraut H, Roussel C, Perpetuini G, Gervais P, Cavin JF. Sensitivity to vinyl phenol derivatives produced by phenolic acid decarboxylase activity in *Escherichia coli* and several food-borne Gram-negative species. Applied microbiology and biotechnology. 2013;97(17):7853-64. Epub 2013/07/13.
 51. THIMANN KV. Physiology of Plant Growth and Development. McGraw-Hill, editor. The auxins, in: M.B. Wilkins (Ed.)1969. 2-45 p.
 52. Costa G, Francisco V, Lopes MC, Cruz MT, Batista MT. Intracellular signaling pathways modulated by phenolic compounds: application for new anti-inflammatory drugs discovery. Current medicinal chemistry. 2012;19(18):2876-900. Epub 2012/04/24.
 53. Campos FM, Couto JA, Figueiredo AR, Toth IV, Rangel AO, Hogg TA. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. International journal of food microbiology. 2009;135(2):144-51. Epub 2009/09/08.
 54. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition. 2004;79(5):727-47. Epub 2004/04/29.
 55. Castelli F, Uccella N, Trombetta D, Saija A. Differences between Coumaric and Cinnamic Acids in Membrane Permeation As Evidenced by Time-Dependent Calorimetry. Journal of agricultural and food chemistry. 1999;47(3):991-5.
 56. Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of p - Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. World Journal of Gastroenterology. 2013;19(43):7726-34.
 57. Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. Biological & pharmaceutical bulletin. 2003;26(7):1057-9. Epub 2003/07/05.

58. Nieva Moreno MI, Zampini IC, Ordonez RM, Jaime GS, Vattuone MA, Isla MI. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(23):8957-62. Epub 2005/11/10.
59. Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Yamada N, Ohta S, Ichihara K, et al. Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2014;21(8-9):1070-7. Epub 2014/05/24.
60. Khosravi AR, Shokri H, Darvishi S, Taghavi M. Immunomodulatory efficacy of ethanol extract of propolis on tumor-bearing mice with disseminated candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*. 2014;24(4):e143-e8.
61. Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Araujo JP, Jr., Sforcin JM. The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phytotherapy research : PTR*. 2010;24(10):1501-7. Epub 2010/09/30.
62. Orsolich N, Sver L, Terzic S, Basic I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. *Veterinary research communications*. 2005;29(7):575-93. Epub 2005/09/06.
63. Archer EJ, Simpson MA, Watts NJ, O'Kane R, Wang B, Erie DA, et al. Long-range architecture in a viral RNA genome. *Biochemistry*. 2013;52(18):3182-90. Epub 2013/04/26.
64. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(6):329-44. Epub 2015/05/21.
65. Vangestel C, Van de Wiele C, Mees G, Peeters M. Forcing cancer cells to commit suicide. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2009;24(4):395-407. Epub 2009/08/22.
66. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(8):589-98. Epub 2001/08/03.
67. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57. Epub 1972/08/01.
68. Seino K, Setoguchi Y, Ogino T, Kayagaki N, Akiba H, Nakano H, et al. Protection against Fas-mediated and tumor necrosis factor receptor 1-mediated liver injury by blockade of FADD without loss of nuclear factor-kappaB activation. *Annals of surgery*. 2001;234(5):681-8. Epub 2001/10/31.
69. Mohan S, Abdelwahab SI, Kamalidehghan B, Syam S, May KS, Harmal NSM, et al. Involvement of NF- κ B and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobioxanthone A. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(11):1007-15.
70. Jada SR, Matthews C, Saad MS, Hamzah AS, Lajis NH, Stevens MFG, et al. Benzylidene derivatives of andrographolide inhibit growth of breast and colon cancer cells in vitro by inducing G1 arrest and apoptosis. *Br J Pharmacol*. 2008;155.
71. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;182.
72. Chen JH, Shao Y, Huang MT, Chin CK, Ho CT. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Cancer letters*. 1996;108(2):211-4. Epub 1996/11/29.
73. Amaravadi RK, Thompson CB. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(24):7271-9.
74. Zeh HJ, Lotze MT. Addicted to death - Invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *Journal of Immunotherapy*. 2005;28(1):1-9.
75. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2006;1757(9-10):1371-87.
76. Goldstein JA, Gallagher MJ, O'Neill WW, Ross MA, O'Neil BJ, Raff GL. A randomized controlled trial of multi-slice coronary computed tomography for evaluation of

- acute chest pain. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(8):863-71. Epub 2007/02/27.
77. Proskuryakov SY, Gabai VL. Mechanisms of tumor cell necrosis. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(1):56-68. Epub 2010/03/11.
 78. Gajski G, Ćimborac-Zovko T, Rak S, Rožman M, Osmak M, Garaj-Vrhovac V. Combined antitumor effects of bee venom and cisplatin on human cervical and laryngeal carcinoma cells and their drug resistant sublines. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;34(12):1332-41.
 79. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(3):153-66. Epub 2009/02/25.
 80. Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell*. 1997;88(3):315-21. Epub 1997/02/07.
 81. Ogino A, Yoshino A, Katayama Y, Watanabe T, Ota T, Komine C, et al. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2005;64(5):398-403. Epub 2005/05/17.
 82. Ekholm SV, Zickert P, Reed SI, Zetterberg A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(9):3256-65. Epub 2001/04/05.
 83. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(4):1286-90. Epub 1974/04/01.
 84. Sun D, Urrabaz R, Buzello C, Nguyen M. Effects of cisplatin on expression of DNA ligases in MiaPaCa human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298:537.
 85. Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, et al. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res*. 2001;61:1029.
 86. Gallagher BM, Jr. Microtubule-stabilizing natural products as promising cancer therapeutics. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(28):2959-67. Epub 2008/01/29.
 87. Singh RP, Agarwal R. Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. *Current drug targets*. 2006;7(3):345-54. Epub 2006/03/07.
 88. Rasul A, Khan M, Yu B, Ma T, Yang H. Xanthoxyletin, a coumarin induces S phase arrest and apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2011;12(5):1219-23. Epub 2011/08/31.
 89. Yang X, Li X, An L, Bai B, Chen J. Silibinin induced the apoptosis of Hep-2 cells via oxidative stress and down-regulating survivin expression. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(8):2289-97. Epub 2013/04/13.
 90. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of ethnopharmacology*. 2011;133(2):253-60.
 91. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002;96(2-3):67-202.
 92. Akbas SH, Timur M, Ozben T. The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells. *J Surg Res*. 2005;125.
 93. Chua PJ, Yip GWC, Bay BH. Cell cycle arrest induced by hydrogen peroxide is associated with modulation of oxidative stress related genes in breast cancer cells. *Exp Biol Med*. 2009;234.
 94. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2004;7(2):97-110. Epub 2004/05/26.
 95. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer cell*. 2006;10(3):241-52. Epub 2006/09/09.
 96. Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003;14(2):64-73. Epub 2003/04/02.

97. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(10):714-26. Epub 2013/09/26.
98. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;455(1):152-62. Epub 1976/11/11.
99. Muller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, et al. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(26):13033-7. Epub 1994/12/20.
100. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(3):219-34. Epub 2006/03/07.
101. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(1):48-58. Epub 2002/03/21.
102. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer cell international*. 2005;5:30. Epub 2005/10/06.
103. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1999;39:361-98. Epub 1999/05/20.
104. Triller N, Korosec P, Kern I, Kosnik M, Debeljak A. Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer*. 2006;54(2):235-40. Epub 2006/08/29.
105. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 2003;10(2):159-65. Epub 2003/04/25.
106. Nooter K, Brutel de la Riviere G, Look MP, van Wingerden KE, Henzen-Logmans SC, Scheper RJ, et al. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *British journal of cancer*. 1997;76(4):486-93. Epub 1997/01/01.
107. Azeredo F J., Uchôa F. T., Costa TD. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009;90(4).
108. Schuurhuis GJ, van Heijningen TH, Cervantes A, Pinedo HM, de Lange JH, Keizer HG, et al. Changes in subcellular doxorubicin distribution and cellular accumulation alone can largely account for doxorubicin resistance in SW-1573 lung cancer and MCF-7 breast cancer multidrug resistant tumour cells. *British journal of cancer*. 1993;68(5):898-908. Epub 1993/11/01.
109. Milroy R. A randomised clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small cell lung cancer. West of Scotland Lung Cancer Research Group, and the Aberdeen Oncology Group. *British journal of cancer*. 1993;68(4):813-8. Epub 1993/10/01.
110. Passerini N, Perissutti B, Albertini B, Voinovich D, Moneghini M, Rodriguez L. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2003;88(2):263-75. Epub 2003/03/12.
111. Abdallah HM, Al-Abd AM, El-Dine RS, El-Halawany AM. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of advanced research*. 2015;6(1):45-62. Epub 2015/02/17.
112. Zhao D, Liu N, Shi K, Wang X, Wu G. Preparation of a multifunctional verapamil-loaded nano-carrier based on a self-assembling PEGylated prodrug. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2015;135:682-8. Epub 2015/09/05.
113. Dong X, Mumper RJ. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(4):597-615. Epub 2010/06/10.
114. Eid SY, El-Readi MZ, Wink M. Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(14):1288-97. Epub 2012/11/14.

115. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):673-751. Epub 2000/12/21.
116. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 1984;226(4673):466-8. Epub 1984/10/26.
117. Triton TR, Yee G. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science*. 1982;217(4556):248-50. Epub 1982/07/16.
118. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992;258(5088):1650-4. Epub 1992/12/04.
119. Fojo A, Akiyama S, Gottesman MM, Pastan I. Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer research*. 1985;45(7):3002-7. Epub 1985/07/01.
120. Takara K, Fujita M, Matsubara M, Minegaki T, Kitada N, Ohnishi N, et al. Effects of propolis extract on sensitivity to chemotherapeutic agents in HeLa and resistant sublines. *Phytotherapy research : PTR*. 2007;21(9):841-6. Epub 2007/05/09.
121. Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*. 1996;42(1):205-11.
122. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*. 1988;44(3):230-2. Epub 1988/03/15.
123. Liao HF, Chen YY, Liu JJ, Hsu ML, Shieh HJ, Liao HJ, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(27):7907-12. Epub 2003/12/24.
124. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girao da Cruz MT, Cordeiro MN, Milhazes N, et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2004;12(13):3581-9. Epub 2004/06/10.
125. Cai H, Huang X, Xu S, Shen H, Zhang P, Huang Y, et al. Discovery of novel hybrids of diaryl-1,2,4-triazoles and caffeic acid as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase for cancer therapy. *European journal of medicinal chemistry*. 2016;108:89-103.
126. Peng W, Wu JG, Jiang YB, Liu YJ, Sun T, Wu N, et al. Antitumor activity of 4-O-(2"-O-acetyl-6"-O-p-coumaroyl-beta-D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. *Chemico-biological interactions*. 2015;233:8-13. Epub 2015/04/01.
127. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer detection and prevention*. 1998;22(6):506-15. Epub 1998/11/21.
128. He N, Shi X, Zhao Y, Tian L, Wang D, Yang X. Inhibitory effects and molecular mechanisms of selenium-containing tea polysaccharides on human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(3):579-88. Epub 2012/12/29.
129. Lu CC, Yang JS, Huang AC, Hsia TC, Chou ST, Kuo CL, et al. Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Molecular nutrition & food research*. 2010;54(7):967-76. Epub 2010/02/20.
130. Kuo YY, Jim WT, Su LC, Chung CJ, Lin CY, Huo C, et al. Caffeic Acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(5):10748-66. Epub 2015/05/20.
131. Rzepecka-Stojko A, Kabala-Dzik A, Mozdierz A, Kubina R, Wojtyczka RD, Stojko R, et al. Caffeic Acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. *Molecules*. 2015;20(5):9242-62. Epub 2015/05/27.

132. Zilius M, Ramanauskiene K, Briedis V. Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin in vitro. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM. 2013;2013:958717. Epub 2013/06/14.
133. Chuu CP, Lin HP, Ciaccio MF, Kokontis JM, Hause RJ, Jr., Hiipakka RA, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. Cancer Prev Res (Phila). 2012;5(5):788-97. Epub 2012/05/09.
134. Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. Cancer letters. 2004;215(2):129-40. Epub 2004/10/19.
135. Ho HC, Chang HC, Ting CT, Kuo CY, Yang VC. Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation and migration, and induces apoptosis in platelet-derived growth factor-BB-stimulated human coronary smooth muscle cells. Journal of vascular research. 2012;49(1):24-32. Epub 2011/10/12.
136. Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Lin WL, Chou FP, Tseng TH. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. Cancer letters. 2006;234(2):199-208. Epub 2005/05/12.
137. Orban Z, Mitsiades N, Burke TR, Jr., Tsokos M, Chrousos GP. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. Neuroimmunomodulation. 2000;7(2):99-105. Epub 2000/02/25.
138. Su ZZ, Lin J, Prewett M, Goldstein NI, Fisher PB. Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. Anticancer research. 1995;15(5B):1841-8. Epub 1995/09/01.
139. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 2005;10:1881-96. Epub 2005/03/17.
140. Wang Y, Tang Q, Jiang S, Li M, Wang X. Anti-colorectal cancer activity of macrostemonoside A mediated by reactive oxygen species. Biochemical and biophysical research communications. 2013;441(4):825-30.
141. Xuan H, Zhao J, Miao J, Li Y, Chu Y, Hu F. Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2011;49(1):78-85. Epub 2010/10/12.
142. Tsai Y-C, Wang Y-H, Liou C-C, Lin Y-C, Huang H, Liu Y-C. Induction of Oxidative DNA Damage by Flavonoids of Propolis: Its Mechanism and Implication about Antioxidant Capacity. Chemical Research in Toxicology. 2012;25(1):191-6.
143. Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. Journal of Venomous Animals and Toxins. 2000;6:205-19.
144. Aroui S, Brahim S, Waard MD, Kenani A. Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study. Biochemical and biophysical research communications. 2010;391(1):419-25. Epub 2009/11/17.
145. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacological reviews. 2004;56(2):185-229. Epub 2004/06/01.
146. Silva R, Carmo H, Dinis-Oliveira R, Cordeiro-da-Silva A, Lima SC, Carvalho F, et al. In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. Archives of toxicology. 2011;85(4):315-26. Epub 2010/09/22.
147. Ullah MF. Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2008;9(1):1-6. Epub 2008/04/29.
148. Harbottle A, Daly AK, Atherton K, Campbell FC. Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. International Journal of Cancer. 2001;92(6):777-83.

Capítulo I - Manuscrito

**Formatado de acordo com as normas da revista "Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry"*

Cytotoxic activity and modulation of P-glycoprotein by Brazilian propolis and caffeic acid towards HEP-2 cells

Lívia Matsumoto da Silva^a; José Maurício Sforcin^{*a}; Yahima Frión-Herrera^a; Ariane Rocha Bartolomeu^a and Carolina Gorgulho^a.

^aDepartment of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil

Abstract

Propolis and its phenolic compounds are known for their antioxidant and anticancer properties. Propolis mechanisms of action have been the subject of research recently. This study aimed to elucidate the effects of propolis and three phenolic compounds (caffeic acid – Caf; dihydrocinnamic acid – Cin; *p*-coumaric acid – Cou) in the same proportion they are found in our propolis sample, alone or in combination, towards human larynx epidermoid carcinoma (HEp-2) cell. Cell viability, apoptosis/necrosis and cell cycle arrest, generation of reactive oxygen species (ROS) and the ability of propolis to induce doxorubicin (DOX) efflux using a P-glycoprotein (P-gp) inhibitor (verapamil) were assayed. Propolis exerted a cytotoxic effect in HEp-2 cells and exhibited an IC₅₀ value of 80 µg/mL, whereas the isolated compounds (alone or in combination) had no effect on cell viability after 72 h. Hence, higher concentrations of these compounds were tested and Caf (IC₅₀: 1.332 µM) induced necrosis in HEp-2 cells, while propolis induced apoptosis, both, probably due to ROS generation. Propolis induced cell cycle arrest at G2/M phase and, Caf at S phase. Propolis or its components, except Caf, can act as a P-gp inhibitor by modulating P-gp activity and favoring the efflux of DOX. Altogether, data suggested that propolis exerted cytotoxic effects against HEp-2 cells and some mechanisms are discussed. Its potential as an antitumor drug should be investigated in further assays.

Key words: Propolis; Caffeic acid; Phenolic compounds; Cytotoxic effect; P-glycoprotein; Hep-2 cells.

1. INTRODUCTION

Natural products contain a wide variety of chemical compounds that have potent biological activity, including antitumor effect (1). Identification of the active components and their mechanism of action are important to assess their potential for clinical use and possible diverse side effects. Propolis is a natural product produced by bees from bud and exudates of plants, and mixed with products of their salivary glands and wax. It is used by bees to seal holes in their honeycombs, smooth out the internal walls, and protect the entrance of beehive against intruders (2, 3). This natural product has been reported to exhibit a broad spectrum of activities including antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, hepatoprotective, and anticancer properties, revealing the therapeutic application of propolis.

Researchers have been attracted to its chemical composition and botanical origin. Brazil has a great variety of flora and notable chemical differences have been found among Brazilian samples (4). Brazilian green propolis is derived mainly from the floral resin of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae), *Eucalyptus citriodora* Hook. (Myrtaceae) and *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae) (5). The sample used in this study is a promising source of bioactive compounds such as caffeic acid phenethyl ester (CAPE), artemisin C, quercetin, resveratrol, among others (6) and has gained popularity for its biological properties, such as antimicrobial (7, 8), immunomodulatory (9, 10) and antitumor (11-13). Polyphenol compounds and their derivatives have been identified in propolis such as caffeic (Caf), dihydrocinnamic (Cin) and *p*-coumaric (Cou) acids and the study of such constituents still deserves investigation (2, 14).

Studies have shown that the anticancer activity of propolis may occur due to its immunomodulatory effect, blocking specific oncogene signaling pathways and modulating the tumor microenvironment (15-17). However, nowadays, the use of propolis as an adjuvant or complementary treatment to anticancer therapies is popular worldwide (18), due to the insensitivity of malignant cells to chemotherapy by expression of P-glycoprotein (P-gp). Therefore, we investigated the antiproliferative and cytotoxic effects of Brazilian propolis and three of its polyphenol constituents (Caf, Cin and Cou) against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells, analyzing apoptosis/necrosis and cell cycle arrest by flow cytometry, as well as their effects on P-gp-mediated efflux of doxorubicin (DOX).

2. MATERIALS AND METHOD

Chemicals and reagents

Complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Cultilab (Campinas, SP, Brazil), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), verapamil hydrochloride and N-acetylcysteine (NAC) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), annexinV-FITC/PI apoptosis kit were obtained from Becton Dickinson (Sao Paulo, SP, Brazil), doxorubicin (DOX) was purchased from Rubidox® (Bergamo, Brazil), penicillin/streptomycin and trypsin TrypLE™ Express was purchased from Gibco Life Technologies (São Paulo, Brazil), caffeic acid, dihydrocinnamic acid, and *p*-coumaric acid were provided from the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo University (Ribeirão Preto, Brazil).

Cell cultures

Human laryngeal epidermoid carcinoma cells (HEp-2), (tissue: HeLa contaminant, disease: carcinoma; organism: human) were used. African green monkey kidney cells (Vero, tissue: kidney, disease: normal; organism: *Cercopithecus aethiops*), were used as a control of non-tumor cells. HEp-2 and Vero were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil) and Virology Laboratory of Biotechnology Institute - IBTec,

UNESP (Brazil), respectively. Both epithelial cell lines were cultivated under standardized conditions in DMEM supplemented with penicillin/streptomycin (1%) and FBS (10%). Mycoplasma cell-free were cultured in 75 cm² flasks and maintained in a humidified atmosphere at 37 °C with 5% CO₂. Studies were conducted when the cells reached 80–90% confluence.

Propolis sample

Propolis produced by Africanized honey bees was collected in UNESP, Campus of Botucatu, southeastern Brazil. Crude propolis was frozen at –20°C. The sample was ground, and 30% ethanolic extracts of propolis were prepared (30 g of propolis, completing the volume 100 mL with 70% ethanol), in the absence of bright light, at room temperature and moderate shaking. After a week, extracts were filtered, and the dry weight of the extract was calculated (110 mg/mL). The main components found in Brazilian propolis sample were previously investigated by GC-MS (6). Propolis was diluted in complete medium, and specific dilutions were prepared for each assay in order to achieve different propolis concentrations: 25, 50, 100 and 120 µg/mL.

The same procedure was carried out with ethanol 70%, in order to observe the effect of propolis solvent found in the highest propolis concentration.

Phenolic compounds

The concentrations of each isolated compounds used in the experiments: Caf (0.297%), Cin (3.040%) and Cou (0.382%) (6) correspond to the relative percentages of this compounds in our propolis sample. Concentrations of each phenolic compounds were prepared diluting the stock solution (100 mg/mL m:v, ethanol 70%) with complete medium.

Cytotoxicity assay

MTT assay was performed to assess cell viability (20) by measuring the ability of cells with active mitochondria to reduce a soluble yellow tetrazolium salt (MTT) to insoluble purple formazan crystals (21).

HEp-2 and Vero cells (2×10^5 cells/mL) were seeded into 96-well plates and treated with propolis (25, 50, 100 e 120 µg/mL), Caf (0.297%), Cin (3.040%) and Cou (0.382%) and with different combinations (C) of phenolic compounds: C1 = (Caf/Cin: 0.297/3.040%), C2 = (Caf/Cou: 0.297/0.382%), C3 =(Cin/Cou: 3.040/0.382%), C4 = (Caf/Cin/Cou: 0.297/3.040/0.382%).The cells were then cultured for 24, 48 and 72 h.

After, 100 µL of MTT solution (1 mg/mL) were added to each well and cells were incubated for 3 h at 37 °C. Formazan crystals were dissolved in DMSO (100 µL per well), the plates were mechanically agitated for 5 min and the absorbance was measured using an automated plate reader (BioTek Instruments, USA) at 540 nm.

Untreated cells were used as a negative control. Absorbance from untreated cells was considered as 100%, and percentage (%) of cell viability was calculated according to the formula: % = [mean experimental absorbance/mean control absorbance] x 100%. The assays were performed in triplicate and the median inhibitory concentration (IC₅₀) values of the cells were determined.

Apoptosis/necrosis evaluation

The induction of apoptosis or necrosis by the variables was assessed by annexin V-FITC and propidium iodide (PI) (AV/PI) apoptosis kit (Becton Dickinson, USA). Cells were seeded (2.0×10^5 cells/mL) in 24-well plates overnight and treated with IC_{50} of propolis and phenolic compounds during 72 h. Untreated cells were used as a control. Cells were then harvested by trypsin, centrifuged ($200 \times g/10$ minutes) and washed twice with phosphate buffered saline (PBS). Staining was performed according to the manufacturer's instructions and samples were analyzed in a FACSCanto™ II (BD Biosciences, USA) flow cytometer with emission filters of 515-545 nm for FITC (green) and 600 nm for PI (red) using FACSDiva (BD Biosciences) software and analyzed using FlowJo software vX 10.6 (Tree Stars Inc.). The percentages of early apoptosis (AV+, PI-), late apoptosis or necrotic (AV+, PI+) and live cells (AV-, PI-) were evaluated.

Cell cycle arrest analysis by flow cytometry

To determine the cell cycle arrest, HEP-2 cells (2.0×10^5 cells/mL) were plated overnight in 24-well plates and treated with IC_{50} of propolis and phenolic compounds during 72 h at 37°C and 5% CO₂. Untreated cells were used as control. Cells were then harvested by trypsin and washed twice with PBS. The pellet was resuspended and fixed in an ice-cold solution of 70% ethanol in PBS (v/v) at -20°C for 1 h. Fixed cells were stained with staining solution (1 µL of PI (1 mg/mL) and 3 µL of RNase A (100 mg/mL) in PBS) at 37°C for 1 h. Samples were acquired in a Flow Cytometer FACSCanto™ II BD (Biosciences, USA) with emission filters of 515-545 nm for FITC (green) and 600 nm for PI (red) using FACSDiva (BD Biosciences) software. The percentages of cells in G0/G1, S and G2/M phases of the cell cycle was determined using FlowJo software vX 10.6 (Tree Stars Inc.).

Influence of reactive oxygen species (ROS) in cell viability

To examine a possible influence of ROS on the viability of treated cells, HEP-2 cells were co-treated with 5 µM of NAC in combination with propolis and Caf (using the IC_{50}) for 72 h. Survival percentage of HEP-2 cells was assessed by MTT assay as described above, in comparison to NAC-treated cells, considered as 100%.

Effect of propolis, Caf and P-glycoprotein inhibitor on doxorubicin cytotoxicity in HEP-2 cells

The sensitivity of HEP-2 cells to DOX associated with a standard P-gp inhibitor (verapamil hydrochloride - VRP) propolis and Caf was determined using the MTT test. Verapamil (VRP) was dissolved in ethanol 70% and added to the cell culture medium at a final concentration of 5 mM. Cells (2×10^5 cells/mL) were then treated with DOX (0.1, 1, 10 and 100 mM) alone or in combination with VRP, propolis and Caf (IC_{50}). Control cells were incubated with either medium alone. Assays were carried out in triplicate. The cytotoxic effect of each treatment with DOX was expressed as the IC_{50} value.

Statistical analysis

The IC₅₀ values were determined by interpolation of the graph of propolis and Caf concentration vs cell viability. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results were analyzed using ANOVA test for comparisons with the control, and Kruskal-Wallis test for multiple comparisons. Significant differences were considered at $p < 0.05$.

3. RESULTS

Viability of HEp-2 cells and Vero cells

To evaluate the effect of cell viability on HEp-2 line by MTT assay, cells were treated with propolis (25, 50, 100 e 120 $\mu\text{g/mL}$) and its isolated compounds alone or in combination (C) in the proportion they were found in this propolis sample (6): Caf (0.297%), Cin (3.040%), Cou (0.382%), C1 = (Caf/Cin: 0.297/3.040%), C2 = (Caf/Cou: 0.297/0.382%), C3 = (Cin/Cou: 3.040/0.382%), C4 = (Caf/Cin/Cou: 0.297/3.040/0.382%) for 24, 48 and 72 h.

Propolis exhibited a dose and time-dependent inhibition of HEp-2 cell growth (Figure 1). The IC₅₀ values of propolis towards HEp-2 cells at 24, 48 and 72 h were 218.5, 160.3 and 80.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The IC₅₀ concentration of 80 $\mu\text{g/mL}$ at 72 h was selected for subsequent experiments. In addition, propolis did not affect Vero cells viability. The IC₅₀ obtained from three independent experiments at 72 h was 116.3 $\mu\text{g/mL}$, showing that propolis exhibited a high selectivity for tumor cells over non-tumor Vero cells.

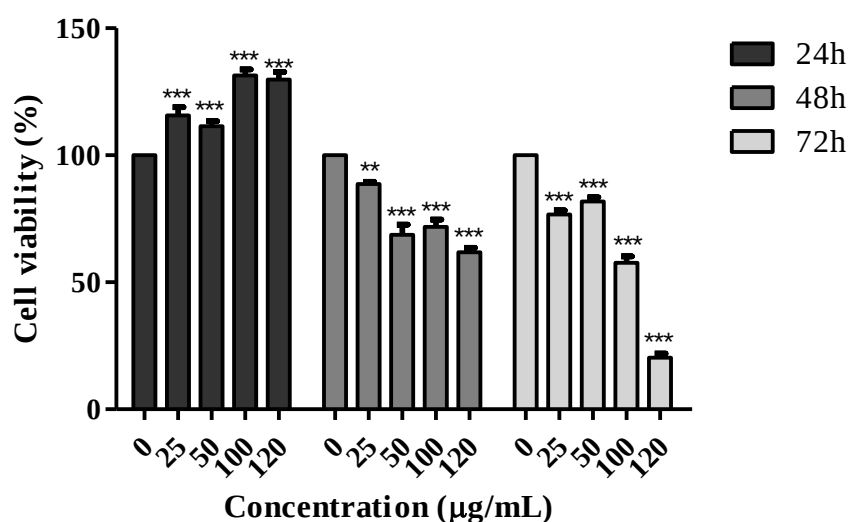


Figure 1. Percentage (%) of HEp-2 cells viability after incubation with propolis (25, 50, 100 e 120 $\mu\text{g/mL}$) for 24, 48 and 72 h. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments vs. control in the respective period of time. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Isolated compounds alone or in combination using the concentrations corresponding to the relative percentages of each compound in our propolis sample (IC_{50}) did not affect HEp-2 cells viability, at 72 h (Figure 2a). The concentrations of phenolic acids in μM were: Caf: 1.332 μM ; Cin: 16.378 μM ; Cou: 1.888 μM .

In order to evaluate higher concentrations of phenolic acids than those found in propolis, which had no effect on HEp-2 cells viability, cells were incubated with 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mM for 72 h. A dose-dependent decrease in cell viability was seen in comparison to untreated cells (Figure 2b). The IC_{50} of each compound was: Caf: 1.355 mM; Cin: 6.032 mM and Cou: 3.425 mM. Caf exhibited a higher antiproliferative effects than Cin and Cou, in this way, for further assays we kept only propolis and Caf treatments.

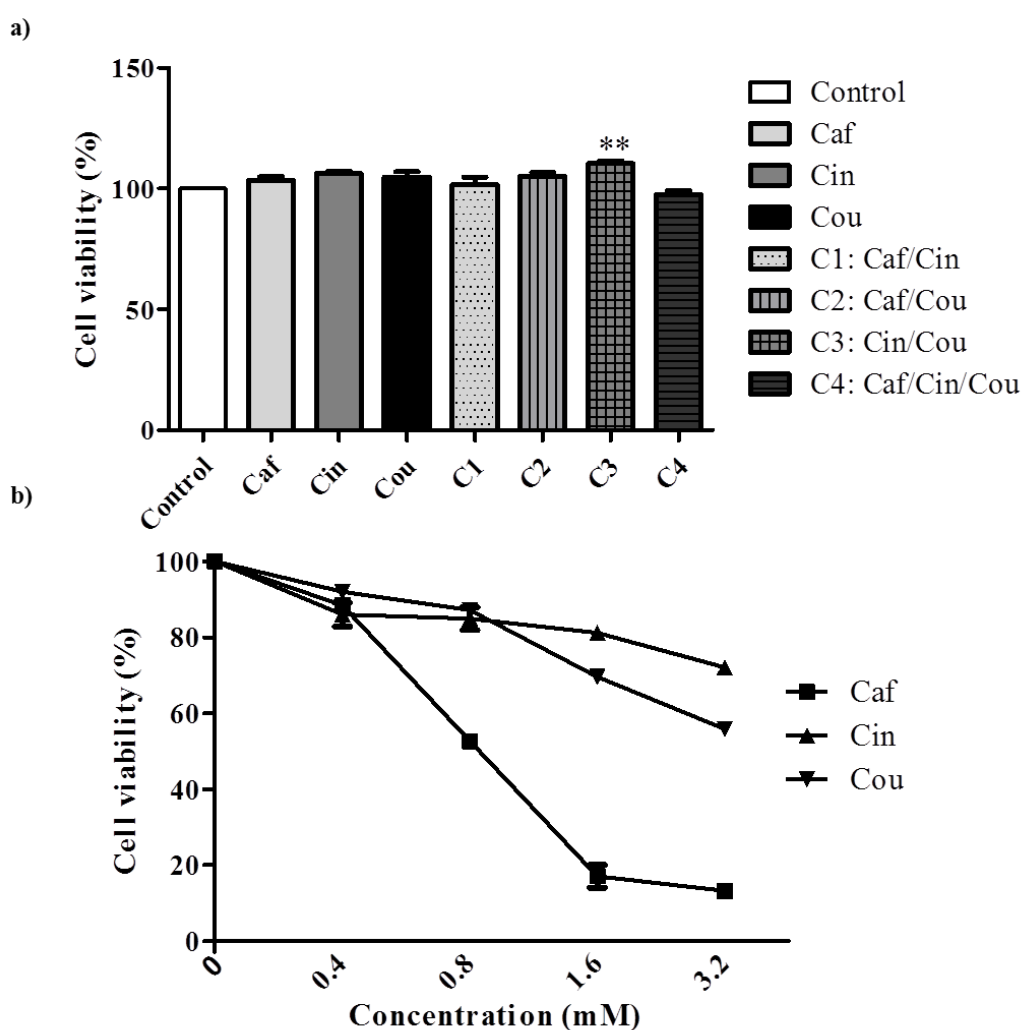


Figure 2. **a)** Percentage (%) of HEp-2 cells viability after incubation with Caf, Cin and Cou alone or in combination (C) using the concentrations corresponding to the relative percentages of each compound in propolis (IC_{50}) for 72 h. **b)** Effect of higher concentrations of phenolic acids (0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mM) on HEp-2 cells viability after 72 h. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments.

Ethanol 70% used as solvent had no effect either on cell morphology or on cell viability (data not shown) suggesting that the cytotoxic effects were exclusively due to propolis and its components.

Flow cytometry analysis of cellular death events

To determine whether the inhibitory activity of propolis (IC₅₀) and Caf (IC₅₀) on HEp-2 cells was related to the induction of apoptosis or necrosis, an annexin V-FITC/PI double staining was performed. Treatment of HEp-2 cells with propolis during 72 h increased the percentage of early apoptotic cells (AV+, PI-) (8.03%) as compared to Caf (3.02%), and the control (4.22%). Caf treatment induced late apoptosis or necrosis (AV+, PI+) as demonstrated by the rapid increase in the percentage (36.2%) as compared to the control (3.04%) and propolis (5.92%) (Figure 3).

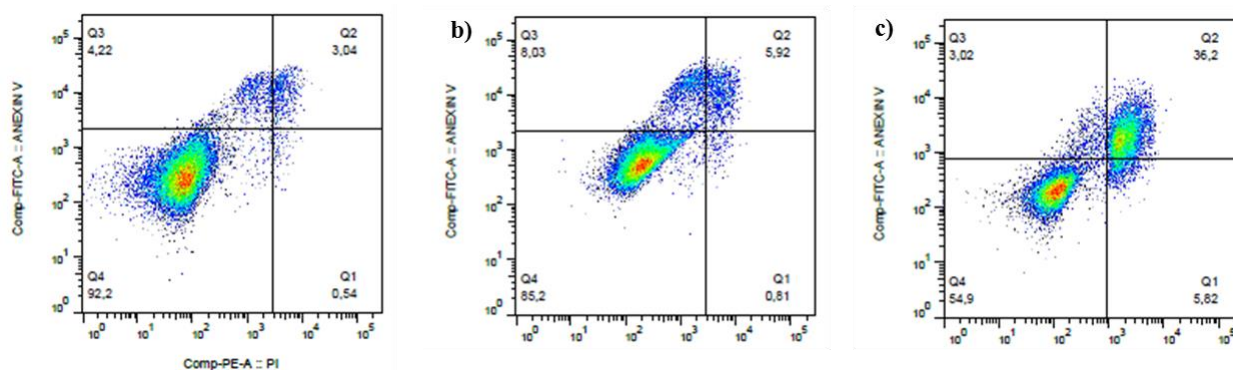


Figure 3. Assessment of apoptosis/necrosis induction in HEp-2 cells by flow cytometry by staining with annexin V/PI. The pseudo color graphs show (a) control; (b) propolis (80 µg/mL) and (c) Caf (1.355 mM), demonstrating the percentage of early apoptotic cells (AV+), late apoptotic or necrotic cells (AV+/PI+ or PI+). Q1 represents early necrotic cells; Q2 represents late apoptotic or necrotic cells; Q3 represents apoptotic cells; Q4 represents live cells.

Influence of propolis and Caf compounds on HEp-2 cell cycle

Interference on cell cycle progression is an appreciated target for cancer management strategies. To determine whether propolis and Caf (IC₅₀) treatment for 72 h could affect the cycle of HEp-2 cells, a PI staining assay by flow cytometer was analyzed.

Treatment with propolis increased the population of cells at G2/M phase (32.0%) compared to control (18.7%). No differences were found at G0/G1 and S phases. Caf decreased the population of cells at G0/G1 phase (38.2%) compared to control (50.6%) with a concomitant increase in the S phase (16.5% vs. 10.3% to control) (Figure 4).

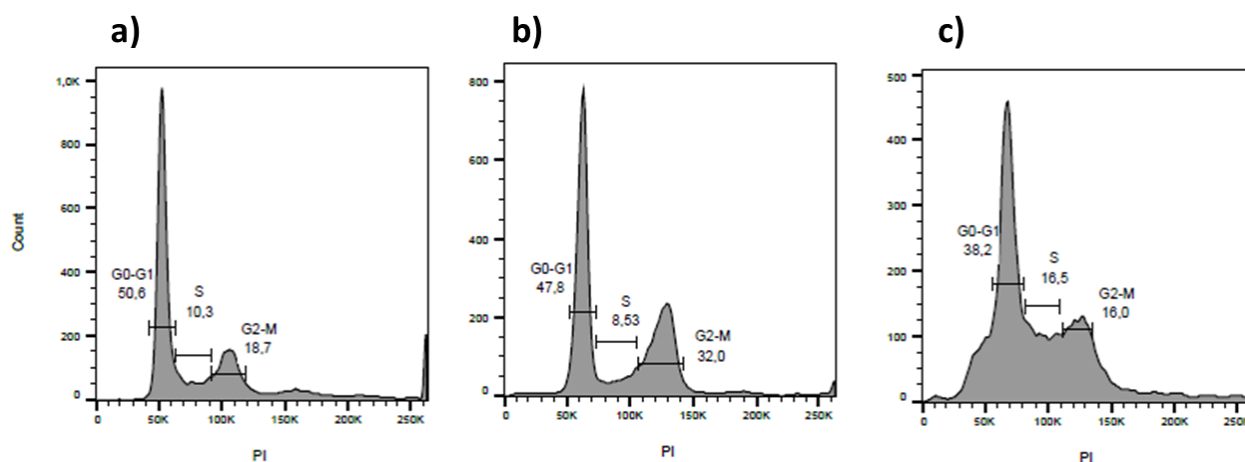


Figure 4. Flow cytometry analysis of HEp-2 incubated for 72 h in the presence of **(a)** complete medium (control); **(b)** propolis (80 µg/mL) and **(c)** Caf (1.355 mM), and stained with PI. Each histogram indicates the percent of cells in G0/G1, S, and G2/M phases of the cell cycle.

N-acetylcystein alleviated the cytotoxic effect of propolis Caf to HEp-2 cells

To investigate whether cell death was mainly due to ROS, HEp-2 cells were co-treated with antioxidant NAC (5mM) propolis (IC_{50}) and Caf (IC_{50}) for 72 h. The co-treatment NAC/propolis and NAC/Caf increased cell viability from 68.40% to 79.2% and 23.13 % to 95.75% respectively (figure 5).

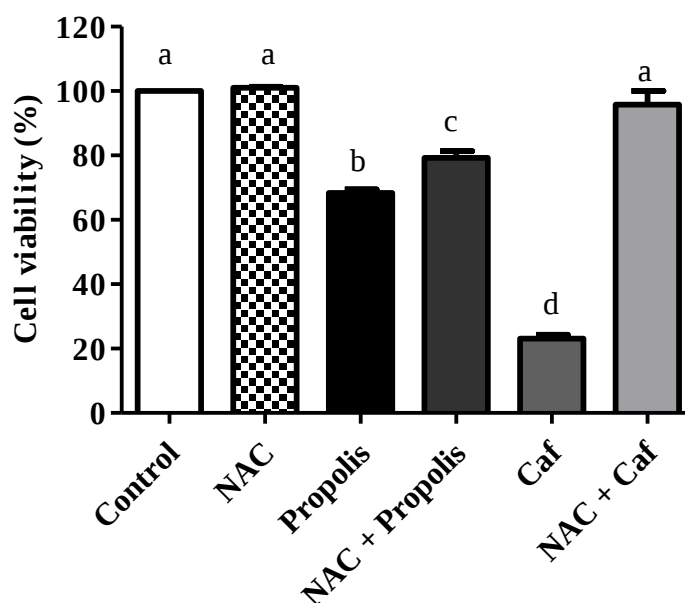


Figure 5. Viability (%) of HEp-2 cells incubated with propolis and Caf with or without NAC (5mM). The percentage (%) of cell viability was measured by MTT after 72 h comparing survival to NAC treated cells. Different letters represent significant differences between the treatments ($p < 0.05$).

Modulation of DOX cytotoxicity by inhibition of P-gp activity in HEp-2 cells

HEp-2 cells exposed to VRP, propolis and Caf for 72 h exhibited a DOX concentration-dependent decrease in cell viability (Figure 6). There were significant differences between VRP/DOX, Propolis/DOX and VRP/propolis/DOX treated cells in comparison to DOX-treated cells (Table 1). Similar cytotoxicity levels were seen for VRP/DOX, Propolis/DOX and VRP/propolis/DOX suggesting that VRP and propolis or its components may bind to P-gp and inhibit the binding or transport of DOX, which is a P-gp substrate. Table 2 shows significant differences between VRP/DOX, VRP/Caf, Caf/DOX and VRP/Caf/DOX treated cells in comparison to DOX-treated cells. The co-treatment VRP/DOX diminished the efflux of this drug by inhibiting P-gp, decreasing cell viability. Caf/DOX decreased cell viability; however, VRP/Caf/DOX treatment revealed that this combination did not affect cell viability indicating that Caf did not affect P-gp-mediated efflux of DOX.

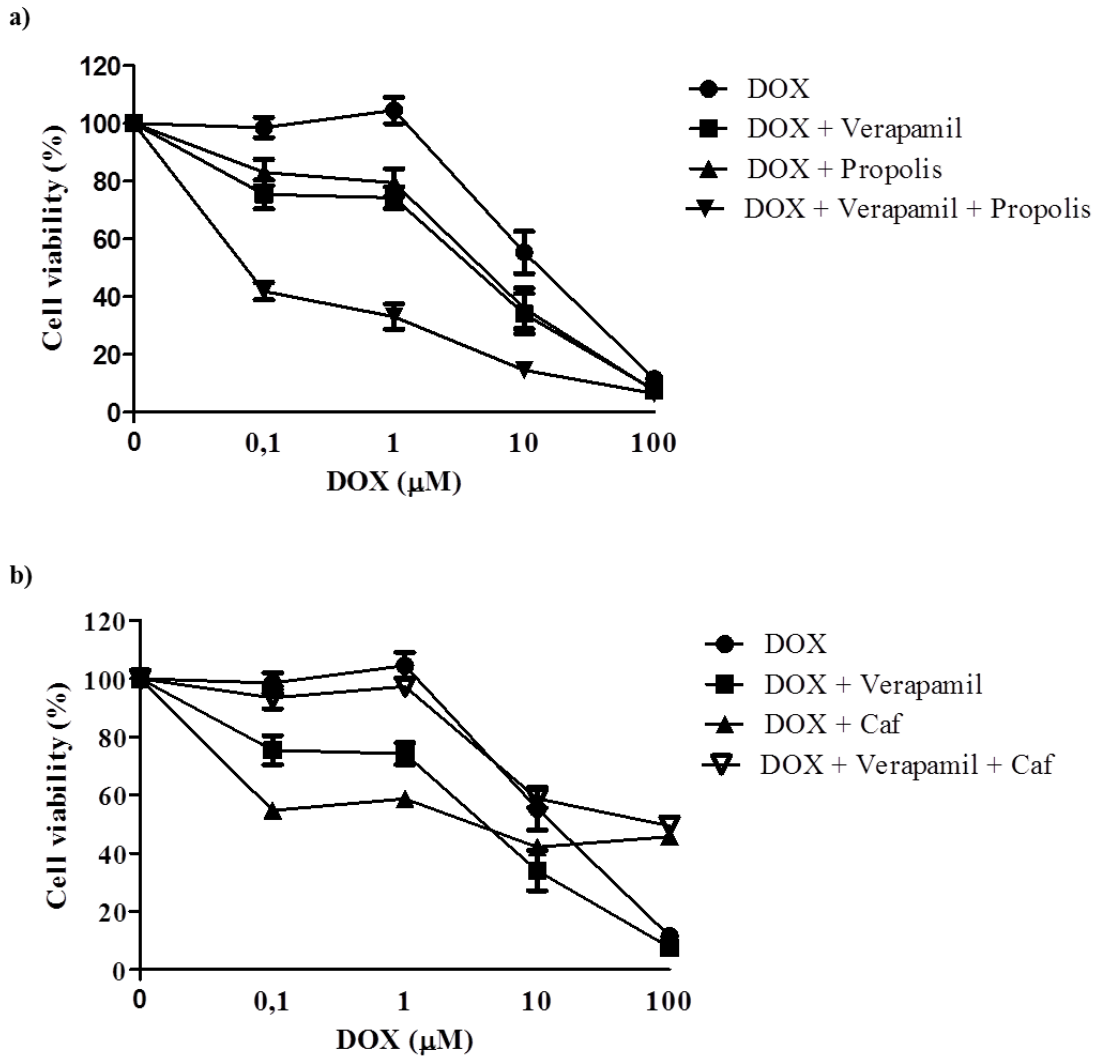


Figure 6. Effects of a P-gp inhibitor (VRP) and propolis on doxorubicin induced cytotoxicity in HEp2 cells. Cell viability was measured by MTT. The percentage of surviving cells is indicated by the

percentage of control absorbance. **a)** The effects of VRP/DOX, Propolis/DOX, VRP/propolis/DOX and DOX were determined. **b)** The effects of VRP/DOX, Caf/DOX, VRP/Caf/DOX and DOX were determined. The results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of three independent experiments, in triplicate.

Table 1. Cytotoxic effect of propolis and VRP simultaneously with DOX.

Treatment	IC ₅₀
DOX	56.60 $\pm$ 17.97 ^a
DOX + VRP	37.88 $\pm$ 16.50 ^b
DOX + Propolis	35.89 $\pm$ 17.09 ^b
DOX+ Propolis + VRP	28.30 $\pm$ 16.46 ^b

Data represent mean $\pm$ standard-deviation (sd) of IC₅₀ values. Different letters represent significant differences between the groups (p < 0.05).

Table 2. Cytotoxic effect of Caf and VRP simultaneously with DOX.

Treatment	IC ₅₀
DOX	56.60 $\pm$ 17.97 ^a
DOX + VRP	37.88 $\pm$ 16.50 ^b
DOX + Caf	67.11 $\pm$ 10.56 ^c
DOX+ Caf + VRP	>100

Data represent mean $\pm$ standard-deviation (sd) of IC₅₀ values. Different letters represent significant differences between the groups (p < 0.05).

4. DISCUSSION

Natural products have been considered as a valuable source of anticancer drugs in recent years (22). The prospect of using natural products is to create more selective and effective cancer treatment. Propolis and its compounds possess strong antitumor potential and are considered as a promising strategy for overcoming the problem of limited efficacy of antitumor drugs (23, 24). Here, we evaluated the antiproliferative and cytotoxic activity of Brazilian propolis and some constituents against HEP-2 cells.

Data showed that propolis decreased HEP-2 cells viability in a dose- and time-dependent manner, showing a higher activity towards this tumor cells compared with non-tumor Vero cells. In contrast, phenolic compounds alone or in combination in the proportional concentration found in our propolis sample did not affect HEP-2 cells viability. Only higher concentrations of phenolic compounds were effective in decreasing cell viability after 72 h. Particularly Caf exhibited a higher antiproliferative effect than Cin and Cou.

Propolis chemical composition is complex and varies according to its vegetal source (25). Our propolis sample contains benzoic acid, Cin, Cou, prenyl-*p*-coumaric,

flavonoids, trihydroxy methoxyflavonon, tetrahydroxyflavonone, triterpenes and artepillin C (6). Several studies on the isolated chemical components of propolis have reported a number of biological responses including anti-tumor activities (26, 27). Caf (28, 29), Cin (30, 31), Cou (32, 33) and artepillin C (34, 35) display potent anti-tumor effects depending on concentration. The antiproliferative effect of our sample could be explained by the presence of artepillin C – one of the major compounds of our sample, and by a possible synergistic effect among propolis constituents, what suggests that our sample may be a promising source of bioactive compounds for laryngeal cancer treatment.

Kumazaki et al. (2014) (31) examined the mechanism of the anti-cancer activity of 3 propolis cinnamic acid derivatives (artepillin C, baccharin, and drupanin) and their combinational effects (each at its IC_{20} concentration) in human colon cancer cell lines (SW480 and DLD-1 and 2 drug-resistant cell lines). They demonstrated that these compounds induced cytotoxic effect when tested at their IC_{50} , but when tested alone at its IC_{20} concentration, they showed no significant growth inhibition. However, the 2-compound combinations significantly suppressed the growth, indicating synergism, which effect was accompanied by the activation of caspase-8. Especially, the combined treatment with baccharin and drupanin showed the most significant apoptosis-inducing effect by activating both apoptosis-signaling pathways.

The possible mechanisms of cell death by which propolis and Caf inhibited HEP-2 cells proliferation were determined by annexin-V-FITC/PI and cell cycle arrest analysis. Our data showed that propolis induced apoptosis with cells cycle arrest in G2/M phase. In contrast, Caf inhibited cell cycle progression of HEP-2 cells in S phase, inducing necrosis. It is well known that apoptosis and cell cycle deregulation are closely related events; however, disruption of cell cycle progression may lead to apoptotic/necrotic death (36), suggesting that both types of death cell may be useful in cancer therapy (37). Our result is in agreement with previous investigation showing that Brazilian green propolis inhibited different cancer cells by inducing apoptosis (11, 38, 39).

Several researches have shown the anticarcinogenic effect of CAPE (26, 40, 41), but little is known regarding Caf effects. CAPE and Caf are different molecules with different physical, chemical, and functional properties (42). CAPE inhibited the proliferation of several human cancer lines including head and neck cancer cells by inducing apoptosis and cell cycle arrest (G1 or G2/M) (40, 43-48) although Caf induced necrosis in our study. Such differences are most likely due to the structure of each molecule; additionally, the apoptotic potential of our propolis sample may be determined by different components.

Recent studies indicated that high levels of ROS may induce apoptosis or necrosis by several mechanisms in tumor cells (49-52). In this study, propolis and Caf decreased significantly HEP-2 cells viability and NAC effectively blocked the ROS generation induced by propolis and Caf and restored cell viability. These results indicated that oxidative stress is a possible mechanism involved in apoptosis and necrosis induction by propolis and Caf, respectively, on HEP-2 cells. Caf is one of the main components of our propolis sample and represent 0.297%. Therefore, differences

between the types of cell death induced by oxidative stress could be explained by propolis composition, cells phenotype and experimental conditions (9, 53).

DOX is an anticancer chemotherapeutic drug commonly used against a wide spectrum of tumors. Its molecular mechanism consists in DNA intercalation and inhibition of topoisomerase II enzyme activity. However, its clinical use is severely limited by cardiotoxicity induced by the generation of ROS (54, 55). It has been reported that different cancer cells show resistance to DOX due to drug efflux mediated via P-gp (56, 57). Therefore, there is a need of introducing new anticancer drug for such kind of resistant cells. Interestingly, our findings showed that the incubation of HEP-2 cells with DOX/VRP, DOX/propolis, VRP/DOX/propolis, DOX/Caf reduced cell viability compared to DOX alone. DOX in combination with VRP or propolis was able to enter within HEP-2 cells more efficiently than DOX alone, in contrast to VRP/DOX/Caf treatment. VRP is a calcium channel blocker and recently it has been associated with reversion of resistance caused by P-gp *in vitro* (58). Based on our findings, it can be suggested that blockage of P-gp channel in HEP-2 cells is a possible mechanism underlying the susceptibility induced by propolis or its components, except Caf, in association with DOX. Our data is in agreement with other reports, showing similar mechanisms to the one triggered by a different sample of propolis, inhibiting the function of MDR1 (P-gp) and increasing the sensitivity to taxol in HeLa cells (18).

CONCLUSION

Propolis inhibited the growth of HEP-2 cells and induced apoptosis mediated by ROS generation. Isolated compounds (Caf, Cin and Cou) at concentrations found in our propolis sample did not affect cell viability, however, higher concentrations exerted significant cytotoxic effects. Particularly, Caf exhibited a higher cytotoxic activity than Cin and Cou, inducing necrosis by ROS generation on HEP-2 cells. Furthermore, differently to Caf, propolis modulated the sensitivity of HEP-2 cells to DOX by inhibiting P-gp activity. Further investigation is needed to elucidate the involvement of propolis against tumor cells.

CONFLICT OF INTEREST

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose. This work was supported by FAPESP.

REFERENCES

1. Sporn MB, Suh N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):525-30. Epub 2000/02/26.
2. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1998;36(4):347-63. Epub 1998/07/03.
3. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73 Suppl 1:S1-6. Epub 2002/12/24.
4. Righi AA, Negri G, Salatino A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013;2013:267878. Epub 2013/05/22.
5. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2005;2(1):33-8. Epub 2005/04/21.

6. Conti BJ, Bufalo MC, Golim Mde A, Bankova V, Sforcin JM. Cinnamic Acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM. 2013;2013:109864. Epub 2013/06/14.
7. Sforcin JM, Fernandes A, Jr., Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. Journal of ethnopharmacology. 2000;73(1-2):243-9. Epub 2000/10/12.
8. Sharaf S, Higazy A, Hebeish A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. International journal of biological macromolecules. 2013;59:408-16. Epub 2013/05/15.
9. Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, Calvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM, et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. Journal of Venomous Animals and Toxins. 2000;6:205-19.
10. Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. Journal of ethnopharmacology. 2005;98(3):301-5. Epub 2005/04/09.
11. Frion-Herrera Y, Diaz-Garcia A, Ruiz-Fuentes J, Rodriguez-Sanchez H, Sforcin JM. Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. The Journal of pharmacy and pharmacology. 2015;67(10):1448-56. Epub 2015/07/25.
12. Fraser SP, Hemsley F, Djamgoz MB. Caffeic acid phenethyl ester: Inhibition of metastatic cell behaviours via voltage-gated sodium channel in human breast cancer in vitro. The international journal of biochemistry & cell biology. 2016;71:111-8. Epub 2016/01/03.
13. Nguyen BC, Taira N, Maruta H, Tawata S, Artepillin C and Other Herbal PAK1-blockers: Effects on Hair Cell Proliferation and Related PAK1-dependent Biological Function in Cell Culture. Phytotherapy research : PTR. 2016;30(1):120-7. Epub 2015/11/06.
14. Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2006;7(1):22-31.
15. Khosravi AR, Shokri H, Darvishi S, Taghavi M. Immunomodulatory efficacy of ethanol extract of propolis on tumor-bearing mice with disseminated candidiasis. Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology. 2014;24(4):e143-e8.
16. Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Araujo JP, Jr., Sforcin JM. The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. Phytotherapy research : PTR. 2010;24(10):1501-7. Epub 2010/09/30.
17. Orsolich N, Sver L, Terzic S, Basic I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumor activity. Veterinary research communications. 2005;29(7):575-93. Epub 2005/09/06.
18. Takara K, Fujita M, Matsubara M, Minegaki T, Kitada N, Ohnishi N, et al. Effects of propolis extract on sensitivity to chemotherapeutic agents in HeLa and resistant sublines. Phytotherapy research : PTR. 2007;21(9):841-6. Epub 2007/05/09.
19. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Jacobson AS, Werner JA, Suárez C, et al. Evolution of the management of laryngeal cancer. Oral Oncology. 2007;43(5):431-9.
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 1983;65(1):55-63.
21. Sieuwerts AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies. 1995;33(11):813-23. Epub 1995/11/01.
22. Pan L, Chai H, Kinghorn AD. The continuing search for antitumor agents from higher plants. Phytochemistry letters. 2010;3(1):1-8. Epub 2010/03/17.
23. Chan GC, Cheung KW, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. Clinical reviews in allergy & immunology. 2013;44(3):262-73. Epub 2012/06/19.
24. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Niklinski J. The anticancer activity of propolis. Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society. 2012;50(1):25-37. Epub 2012/04/26.
25. Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. Phytochemistry. 1996;42(1):205-11.
26. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. Experientia. 1988;44(3):230-2. Epub 1988/03/15.
27. Liao HF, Chen YY, Liu JJ, Hsu ML, Shieh HJ, Liao HJ, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. Journal of agricultural and food chemistry. 2003;51(27):7907-12. Epub 2003/12/24.
28. Fiuza SM, Gomes C, Teixeira LJ, Girao da Cruz MT, Cordeiro MN, Milhazes N, et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. Bioorganic & medicinal chemistry. 2004;12(13):3581-9. Epub 2004/06/10.
29. Cai H, Huang X, Xu S, Shen H, Zhang P, Huang Y, et al. Discovery of novel hybrids of diaryl-1,2,4-triazoles and caffeic acid as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase for cancer therapy. European journal of medicinal chemistry. 2016;108:89-103.
30. Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. Biological & pharmaceutical bulletin. 2003;26(7):1057-9. Epub 2003/07/05.
31. Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Yamada N, Ohta S, Ichihara K, et al. Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 2014;21(8-9):1070-7. Epub 2014/05/24.
32. Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of p -Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. World Journal of Gastroenterology. 2013;19(43):7726-34.
33. Peng W, Wu JG, Jiang YB, Liu YJ, Sun T, Wu N, et al. Antitumor activity of 4-O-(2"-O-acetyl-6"-O-p-coumaroyl-beta-D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. Chemico-biological interactions. 2015;233:8-13. Epub 2015/04/01.
34. Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. Cancer letters. 2007;252(2):235-43. Epub 2007/03/09.
35. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. Cancer detection and prevention. 1998;22(6):506-15. Epub 1998/11/21.

36. He N, Shi X, Zhao Y, Tian L, Wang D, Yang X. Inhibitory effects and molecular mechanisms of selenium-containing tea polysaccharides on human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(3):579-88. Epub 2012/12/29.
37. Lu CC, Yang JS, Huang AC, Hsia TC, Chou ST, Kuo CL, et al. Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Molecular nutrition & food research*. 2010;54(7):967-76. Epub 2010/02/20.
38. Drago E, Bordonaro M, Lee S, Atamna W, Lazarova DL. Propolis augments apoptosis induced by butyrate via targeting cell survival pathways. *PloS one*. 2013;8(9):e73151. Epub 2013/09/12.
39. Cheung KW, Sze DM, Chan WK, Deng RX, Tu W, Chan GC. Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;138(2):463-71. Epub 2011/10/04.
40. Kuo YY, Jim WT, Su LC, Chung CJ, Lin CY, Huo C, et al. Caffeic Acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(5):10748-66. Epub 2015/05/20.
41. Rzepecka-Stojko A, Kabala-Dzik A, Mozdziejz A, Kubina R, Wojtyczka RD, Stojko R, et al. Caffeic Acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. *Molecules*. 2015;20(5):9242-62. Epub 2015/05/27.
42. Zilius M, Ramanauskiene K, Briedis V. Release of propolis phenolic acids from semisolid formulations and their penetration into the human skin in vitro. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013;2013:958717. Epub 2013/06/14.
43. Chu CP, Lin HP, Ciaccio MF, Kokontis JM, Hause RJ, Jr., Hiipakka RA, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(5):788-97. Epub 2012/05/09.
44. Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer letters*. 2004;215(2):129-40. Epub 2004/10/19.
45. Ho HC, Chang HC, Ting CT, Kuo CY, Yang VC. Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation and migration, and induces apoptosis in platelet-derived growth factor-BB-stimulated human coronary smooth muscle cells. *Journal of vascular research*. 2012;49(1):24-32. Epub 2011/10/12.
46. Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Lin WL, Chou FP, Tseng TH. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer letters*. 2006;234(2):199-208. Epub 2005/05/12.
47. Orban Z, Mitsiades N, Burke TR, Jr., Tsokos M, Chrousos GP. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(2):99-105. Epub 2000/02/25.
48. Su ZZ, Lin J, Prewett M, Goldstein NI, Fisher PB. Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. *Anticancer research*. 1995;15(5B):1841-8. Epub 1995/09/01.
49. Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003;14(2):64-73. Epub 2003/04/02.
50. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2005;10:1881-96. Epub 2005/03/17.
51. Wang Y, Tang Q, Jiang S, Li M, Wang X. Anti-colorectal cancer activity of macrostemonoside A mediated by reactive oxygen species. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;441(4):825-30.
52. Xuan H, Zhao J, Miao J, Li Y, Chu Y, Hu F. Effect of Brazilian propolis on human umbilical vein endothelial cell apoptosis. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2011;49(1):78-85. Epub 2010/10/12.
53. Tsai Y-C, Wang Y-H, Liou C-C, Lin Y-C, Huang H, Liu Y-C. Induction of Oxidative DNA Damage by Flavonoids of Propolis: Its Mechanism and Implication about Antioxidant Capacity. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(1):191-6.
54. Aroui S, Brahim S, Waard MD, Kenani A. Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;391(1):419-25. Epub 2009/11/17.
55. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*. 2004;56(2):185-229. Epub 2004/06/01.
56. Silva R, Carmo H, Dinis-Oliveira R, Cordeiro-da-Silva A, Lima SC, Carvalho F, et al. In vitro study of P-glycoprotein induction as an antidotal pathway to prevent cytotoxicity in Caco-2 cells. *Archives of toxicology*. 2011;85(4):315-26. Epub 2010/09/22.
57. Ullah MF. Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2008;9(1):1-6. Epub 2008/04/29.
58. Harbottle A, Daly AK, Atherton K, Campbell FC. Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *International Journal of Cancer*. 2001;92(6):777-83.