



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

João Carlos Zamae Rodrigues

**Ação imunomoduladora da própolis vermelha sobre
monócitos humanos e citotóxica sobre células de
câncer prostático**

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

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin
Coorientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Karina Basso Santiago

**Botucatu
2021**

João Carlos Zamae Rodrigues

**Ação imunomoduladora da própolis vermelha
sobre monócitos humanos e citotóxica sobre
células de câncer prostático**

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

Orientador: Prof.Dr. José Maurício Sforcin
Coorientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Karina Basso Santiago

Botucatu
2021

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

Rodrigues, João Carlos Zamae.

Ação imunomoduladora da própolis vermelha sobre monócitos humanos e citotóxica sobre células de câncer prostático / João Carlos Zamae Rodrigues. - Botucatu, 2021

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

Orientador: José Maurício Sforcin

Coorientador: Deilson Elgui de Oliveira

Coorientador: Karina Basso Santiago

Capes: 40101045

1. Próstata - Câncer. 2. Própolis. 3. Monócitos.
4. Neoplasias.

Palavras-chave: Ação antitumoral; Câncer de próstata; Monócito; Própolis; Tumor.

Dedicatória

Aos meus amados Gurumaharaj, Srila Bhakti Vijnana Bharat Gosvami, e Gurudev, Bhaktivedanta Siddhanti Maharaj.

Aos meu pai e minha mãe (*in memoriam*)

Ao meu querido irmão espiritual Krsna Dasa Prabhu

Àquela que me acolheu como um filho, Lavanya Mayi Devi Dasi.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. José Maurício Sforcin e aos meus coorientadores, Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira e Profa. Dra. Karina Basso Santiago, pela oportunidade de aprendizado, crescimento profissional e pessoal.

Aos grupos de pesquisa Virican e LIPNA pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo fomento à minha pós-graduação.

Aos departamentos de Patologia da FMB, de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências Botucatu, e ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC) por terem cordialmente me recebido.

À Vânia Soler por toda gentileza e colaboração.

À minha instituição de trabalho, Universidade Vale do Salgado- UniVS, e particularmente ao Diretor Prof. MSc. Wilson Santos, pelo apoio, incentivo e compreensão durante o processo de conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas Marcos Jonaty, Geralda Angelim e Evandro Nogueira por trazerem tanta alegria ao meu dia a dia.

Aos meus queridos Krsna Dasa Prabhu e Lavanya Mayi Devi Dasi por preencherem o vazio que havia no meu coração, e pelo constante incentivo à vida espiritual.

Ao meu pai pelo infinito suporte.

Do musical *Wicked*, uma sequência da célebre peça de teatro O Mágico de Oz.

As someone told me lately

"Everyone deserves the chance to fly!"

And if I'm flying solo

At least I'm flying free

To those who ground me

Take a message back from me

Tell them how I am defying gravity!

(...)

And nobody in all of Oz

No wizard that there is or was

Is ever gonna bring me down!

composta por Stephen Schwartz, 2001

Resumo

A própolis vermelha do Brasil (BRP- *brazilian red propolis*) apresenta diversas atividades, tais como anti-inflamatória e citotóxica contra várias linhagens tumorais. Visto que há poucos trabalhos científicos realizados com a BRP, no presente trabalho investigamos os efeitos da mesma sobre monócitos humanos e sobre as linhagens tumorais prostáticas LNCaP e PC3. Para tanto, avaliamos a composição química da BRP e o efeito do seu extrato etanólico em comparação ao docetaxel sobre a expressão de marcadores celulares (TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD80) em monócitos humanos, e também sobre a viabilidade das linhagens tumorais LNCaP e PC3. Os compostos predominantes na BRP foram liquiritigenina, isoliquiritigenina, vestitol, neovestitol, medicarpina, 7-O-metilvestitol, gutiferona E e oblongifolina B. A BRP não afetou a viabilidade dos monócitos e manteve a expressão de TLR-2, TLR-4 e HLA-DR em todas as concentrações avaliadas, e estimulou a expressão de CD80 na concentração de 75 µg/mL. Quanto às linhagens tumorais, a PC3 mostrou-se mais resistente à ação da BRP do que a linhagem LNCaP em todas as concentrações e momentos avaliados (24, 48 e 72h), mas às 48h e 72h para LNCaP nas concentrações de 50 a 100 µg/ml, e para PC-3 com 25 µg/ml, foram estatisticamente iguais àqueles gerados pelo tratamento com docetaxel. Tomados em conjunto, esses resultados fazem da BRP um composto promissor para novos estudos na área da terapia oncológica.

Palavras-chave: ação antitumoral; câncer de próstata; monócito; própolis; tumor

Abstract

Brazilian red propolis (BRP- brazilian red propolis) has several activities, such as anti-inflammatory and cytotoxic against various tumor strains. Seeing that there are few scientific studies carried out with BRP, in the present work we investigated the effects of it on human monocytes of healthy individuals and on LNCaP and PC3 prostatic tumor lines. Therefore, we evaluated the chemical composition of BRP and the effect of its ethanolic extract compared to docetaxel on the expression of cellular markers (TLR-2, TLR-4, HLA-DR, CD80) in human monocytes, and also on the viability of the LNCaP and PC3 tumor lines compared to docetaxel. The predominant compounds in BRP were liquiritigenin, isoliquiritigenin, vestitol, neovestitol, medicarpine, 7-O-methylvestitol, gutiferone E and oblongifolin B. BRP did not affect monocyte viability, maintained the expression of TLR-2, TLR-4 and HLA-DR, and stimulated the expression of CD80. As for tumor lines, PC3 was more resistant to the action of BRP than the line LNCaP, and at 48h and 72h for LNCAP in concentrations of 50 to 100 µg/ml, and for PC-3, 25 µg/ml, were statistically equal to those generated by treatment with docetaxel. Taken together, these results make BRP a promising compound for further studies in the field of oncology therapy.

Key-words: antitumor action; monocyte; propolis; prostate cancer; tumor

Lista de Ilustrações

Figura 1. Amostra de própolis vermelha evidenciando sua coloração típica.....	3
Figura 2. Esquema resumido dos procedimentos experimentais.....	9
Figura 3. Composição química da própolis vermelha produzida em Canavieiras, Bahia, Brasil, obtida por cromatografia líquida (HPLC-DAD).....	15
Figura 4. Viabilidade (%) da linhagem PC3 após incubação com meio de cultura apenas (controle – C), própolis vermelhas em diferentes concentrações, docetaxel (D – 100 nM/mL) e o solvente da própolis (E – etanol 70%) (P < 0,05). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 em relação ao controle (C).....	17
Figura 5. Viabilidade (%) da linhagem LNCaP após incubação com meio de cultura (controle – C), BRP em diferentes concentrações (2, 3.5, 5, 10, 20, 25, 50, 75 e 100µg/ml) , docetaxel (D – 100 nM/mL) e o solvente da própolis (E – etanol 70%) (P < 0,05). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 em relação ao controle (C).....	18
Figura 6. Viabilidade (%) dos monócitos após incubação com meio de cultura (controle – C), BRP em diferentes concentrações (5, 25, 50, 75 µg/ml), docetaxel (D – 100 nM/mL), e LPS (L – 5 µg/mL [P < 0,05]). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 em relação ao controle (C).....	19
Figura 7. Expressão (%) de CD80 (a), HLA-DR (b), TLR-2 (c) e TLR-4 (d) por monócitos humanos incubados por 24h com meio de cultura (controle – C), própolis vermelha (5, 25, 50 e 75 µg/ml), docetaxel (D – 100 nM/mL) e LPS (L – 5 µg/ml). * P < 0,05 vs. controle (média ± DP; n = 5). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 com relação ao controle (C).....	20

Sumário

1.Revisão De Literatura.....	1
2.Justificativa Do Projeto.....	8
3.Objetivos.....	8
3.1.Objetivo Geral.....	8
3.2.Objetivos Específicos.....	8
4.Material e Métodos.....	9
4.1.Desenho Experimental.....	9
4.2.BRP e docetaxel.....	10
4.3.Linhagens Celulares Neoplásicas Prostáticas.....	11
4.4.Avaliação da viabilidade celular das linhagens prostáticas.....	11
4.5.Monócitos Humanos.....	12
4.6.Isolamento das células CD14+.....	12
4.7. Avaliação da viabilidade celular dos monócitos.....	13
4.8. Expressão de marcadores celulares dos monócitos.....	13
4.9 Análise Estatística.....	14
5. Resultados.....	14
5.1. Composição química da própolis.....	14
5.2. Ensaio citotóxico com as células PC3 e LNCaP.....	15
5.3. Efeito da própolis da viabilidade dos monócitos.....	19
5.4. Efeito da própolis na expressão de TLR-2, TLR-4, HLA-DR e CD80 pelos monócitos.....	19
6. Discussão.....	21
7. Conclusão.....	31
8. Referências bibliográficas.....	31
9. Anexos.....	42
9.1. Consentimento livre e esclarecido para participação em pesquisa de indivíduos saudáveis.....	42

1. Revisão de Literatura

Segundo o último relatório da ABEMEL (Associação Brasileira dos Exportadores de Mel) o Brasil exportou 27.052.938 toneladas de própolis, gerando um ganho de 121.298.088,00 dólares. Nesse último relatório, o Brasil figura na nona posição dentre os 20 maiores exportadores mundiais do produto (ABEMEL, 2018).

A própolis (CAS N° 9009-62-5) é um produto apícola constituído dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos das árvores coletados pelas abelhas. Além desses elementos, as abelhas adicionam à essa mistura suas próprias secreções salivares e enzimas (por exemplo, tripsina, lipase, esterase, quimiotripsina e beta-galactosidase) presentes no seu aparato bucal produzidas pelas glândulas hipofaríngeas, salivares e mandibulares (FRANCO et al., 2000; PEREIRA et al., 2002; COUTO et al., 2002). O material resultante é um composto complexo de característica balsâmica e resinosa utilizado pelas abelhas na constituição estrutural da colmeia — por exemplo, para vedar frestas e recobrir superfícies irregulares —, e também na defesa e manutenção da mesma, já que insetos e outros invasores que venham a morrer no interior da colmeia serão embalsamados com a própolis evitando a decomposição dos seus corpos (TORETI et al., 2013). Além disso, a própolis também protege as abelhas de doenças que podem acometer a colônia (GHISALBERTI, 1979; TORETI et al., 2013).

Desde as últimas décadas do século vinte a própolis vem recebendo destaque crescente dentro da comunidade científica pelas suas comprovadas propriedades biológicas e farmacológicas. Por isso podemos encontrar a própolis na formulação industrial de produtos como condicionadores, xampus, sabonetes, dentifrícios, batons, balas, chás, protetores solares, géis pós-barba, cremes e pomadas (LUSTOSA et al., 2008). Embora essas apresentações industrializadas sejam mais recentes, o uso da própolis para fins medicinais certamente não o é (GHISALBERTI, 1979; SFORCIN & BANKOVA, 2011). Os egípcios já conheciam as suas propriedades anti-putrefativas e empregavam-na no processo de mumificação dos cadáveres (SANTOS, 2015), e médicos gregos e romanos como Plínio (23 – 79 d.C.), Dioscórides (40 – 90 d.C.) e Cláudio Galeno (130 – 210 d.C.) (CASTALDO & CAPASSO, 2002) utilizavam com frequência a própolis como medicamento emergencial nas feridas dos soldados.

O estudo da composição química da própolis tem sido o foco de vários estudos (ANJUM et al., 2019; ŠTURM & ULRIH, 2019), e para isso há diferentes técnicas para separação e purificação dos seus componentes como a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Essa técnica permitiu a identificação de mais compostos das classes dos flavonóides, terpenos, fenóis, ésteres, açúcares, hidrocarbonetos e minerais (MACIEJEWICZ, 2001; CAMPO FERNANDEZ et al., 2008).

A própolis não pode ser usada em seu estado bruto, assim como é encontrada nas colméias, ela deve ser purificada por técnicas de extração para que o material inerte seja removido e as frações desejáveis, como a dos polifenóis, sejam preservadas (PIETTA et al., 2002). Para tanto, os solventes mais comumente utilizados são a água, o metanol, o etanol, o clorofórmio, o diclorometano, o éter e a acetona (CVEK et al., 2008). Esses diferentes solventes podem extrair diferentes compostos, e também influenciar suas atividades (CUNHA et al., 2004). Desses diferentes extratos, os extratos etanólicos da própolis têm atraído o interesse dos pesquisadores pelas suas propriedades biológicas (YASUI et al., 2008; SZLISZKA et al., 2009; LI et al., 2010). Frozza et al. (2017), por exemplo, demonstraram que os extratos etanólicos da BRP nas concentrações de 5, 15, 25, 35, 50 e 75 ug/mL exerceram atividade citotóxica em células Hep-2 (carcinoma cervical) mais proeminente do que quando comparadas ao seu extrato bruto.

Embora haja diferenças na composição química das amostras de própolis de diferentes origens geográficas e botânicas, de modo geral ela é composta por 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias como minerais e moléculas orgânicas, como ácidos fenólicos e os flavonóides (BANKOVA, 2005; BARLAK et al., 2011). Devido à dimensão continental do Brasil, que abriga grande diversidade botânica e de ecossistemas, as propriedades das própolis produzidas aqui variam de uma região para a outra (INOUE et al., 2007). A coloração das amostras de própolis também varia e pode se apresentar nas tonalidades vermelha, creme, amarela, verde e marrom escura ou clara (SALATINO et al., 2005). Entretanto, a distinção das amostras baseada em sua coloração não é suficientemente precisa para a comunicação científica. Para isso, a classificação das amostras deve ser feita de acordo com sua origem botânica e composição química (SFORCIN, 2016). No Brasil as própolis verde, marrom e vermelha têm como principais fontes botânicas a *Baccharis dracunculifolia* para a

própolis verde; *Araucaria* sp. e *Eucalyptus* sp. (entre outras plantas) para a própolis marrom; e *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub para a própolis vermelha (MACHADO DE MELO et al., 2012).

A *D. ecastophyllum* é uma espécie arbustiva encontrada no Brasil majoritariamente na região costeira, sobretudo no nordeste (nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Sergipe e Pernambuco) em biomas de mangue (PARK et al., 2002; SILVA et al., 2008). Ela é popularmente chamada de “rabo-de-bugio”, “marmelo-do-mangue” e “marmeleiro-da-praia”, e pertence à família Fabaceae, que se divide em cerca de 100 espécies (SILVA et al., 2019). No Brasil, a própolis vermelha foi descrita pela primeira vez nos trabalhos de DAUGSCH et al. (2008) e atualmente integra o total de 13 tipos de própolis descritos na literatura. Muitos constituintes químicos da própolis vermelha já foram identificados, tais como a elemicina, a isoelemicina, o metil-eugenol, o metil isoeugenol, a formononetina, a biocanina A, a isoliquiritigenina, a liquiritigenina, a medicarpina, a homopterocarpina, a quercetina e o vestitol (TRUSHEVA et al., 2006; ÖZAN et al., 2007; SILVA et al., 2008). Dentre seus componentes, a coloração característica da BRP, conforme apresentado na Figura 1, foi atribuída às isoflavonas retusapurpurinas A e B, que são pigmentos pertencentes ao grupo do flavonóides e estão presentes na resina de *D. ecastophyllum* (PICCINELLI et al., 2011). Todavia, sua coloração pode variar do vermelho-alaranjado até vermelho intenso. Essa variação ocorre entre diferentes regiões e mesmo dentre as amostras coletadas em uma mesma região (Lopez et al., 2017).



Figura 1. Amostra de própolis vermelha evidenciando sua coloração típica. Fonte: <https://bit.ly/2neiSR7>.

A própolis vermelha é uma fonte promissora de novos compostos bioativos, haja vista suas já relatadas atividades citotóxica e antiproliferativa em linhagens tumorais humanas de glioblastoma (SF-295), carcinoma ovariano (OVCAR-8), carcinoma de cólon (HCT-116) e carcinoma cervical (Hep-2); antibacteriana em *Salmonella typhimurium*; antioxidante em neutrófilos humanos; antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes*; antiproliferativa; anti-inflamatória e imunomoduladora em ratos (SIQUEIRA et al., 2009; RIGHI et al., 2011; FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2013; PINHEIRO et al., 2014; DE MENDONÇA et al., 2015; FROZZA et al., 2017). De acordo com Búfalo et al. (2014) e de Figueiredo et al. (2014), também há evidências do potencial imunomodulador da própolis devido, em parte, à sua influência nos eventos iniciais da resposta imune, induzindo a expressão de receptores celulares (por exemplo, os *Toll-like-receptors 2* e 4), a produção de citocinas (por exemplo, as de natureza pró-inflamatória como TNF-alfa, IL-1beta e IL-6) (ORSATTI et al., 2010), e também a geração de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio pelos macrófagos (ORSI et al., 2000). É importante salientar que a própolis pode exercer tanto atividades pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, inibindo ou estimulando a ação de diversos elementos da resposta imunológica dependendo da concentração utilizada (SFORCIN, 2016).

Recentemente o nosso grupo de pesquisa deu início aos estudos de imunomodulação utilizando monócitos e células dendríticas humanas (BÚFALO et al., 2014; CONTI et al., 2016; CARDOSO et al., 2017). Os monócitos são as células que dão origem a todos os outros tipos celulares que compõem o sistema mononuclear fagocitário (HUME, 2006), importante componente do sistema imune inato, e podem ser diferenciados dos macrófagos segundo a sua localização (monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos), volume nuclear e citoplasmático (menores nos monócitos), e diferença nas quantidades de mieloperoxidases e esterases não-específicas (respectivamente em maior e menor quantidade nos monócitos) (WALLNER et al., 2016).

Os macrófagos têm papel importante na elaboração de diferentes respostas a diferentes antígenos. Estas respostas são dependentes dos ligantes expressos por essas células, dentre os quais podem-se destacar os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* — TLRs) (FREEMAN & GRISTEIN, 2014), que são proteínas transmembrana importantes para a detecção e o reconhecimento de patógenos,

para a geração de sinais para a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-1, IL-8, e também de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 e CD40 (KAWAI & AKIRA, 2010). Os TLRs são importantes para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *pathogen-associated molecular patterns* — PAMPs) e também de outras moléculas, oriundas de células estressadas, feridas, infectadas ou transformadas chamadas de padrões moleculares associados ao perigo (*danger-associated patterns* — DAMPs) (PANDEY et al., 2015), além da distinção daquilo que é próprio (*self*) do que é não-próprio (*non-self*) (MEDZHITOV, 2001). Uma vez ativados, mediante a interação com os PAMPs ou DAMPs, os domínios intracelulares dos TLRs interagem com a molécula adaptadora MyD88 e iniciam uma cascata de sinalização comum que leva à translocação nuclear dos fatores de transcrição NF-kB (*nuclear factor kB*), e da proteína ativadora AP-1 (ARANCIBA et al., 2007), induzindo a produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (TAKEDA & AKIRA, 2005).

Na indução da resposta imune participam também moléculas co-estimuladoras como CD80 (CHAI et al., 1999), uma proteína de membrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas, que exerce diversas funções na regulação dos sistemas imune inato e adaptativo (ZHENG et al., 2004) devido à interação com CD28 e CTLA-4 presentes na superfície das células T, dos monócitos, das células dendríticas e das células B (OWEN et al., 2013); permitindo a rápida comunicação entre essas células (VAN DER MERWE et al., 1997).

Apesar de haver um considerável número de trabalhos acerca da ação da própolis verde sobre os monócitos humanos, há poucos dados do efeito da própolis vermelha sobre essas células, dentre os quais está o trabalho pioneiro do nosso grupo realizado por Conti et al. (2015), cujo objetivo foi avaliar comparativamente a indução da produção de citocinas por três amostras de própolis, dentre elas a BRP. Nós aqui damos continuidade aos estudos com a BRP avaliando sua composição química e sua ação sobre os monócitos, agora abordando também seu efeito sobre as células neoplásicas.

Nos últimos anos também foram investigadas *in vitro* e *in vivo* as propriedades da própolis vermelha contra linhagens de câncer cervical (HeLa) (ALENCAR et al., 2007), colônico (26-L5), melanoma (B16-BL6), câncer de pulmão (A549), fibrossarcoma (AWALE et al., 2008), câncer de mama (MCF-7) (KAMIYA et al., 2012) e de laringe (Hep-2) (FROZZA et al., 2013). Em relação aos possíveis mecanismos

de ação da BRP, as atividades contra células neoplásicas incluem a indução da apoptose e a redução da capacidade de migração celular (BEGNINI et al., 2014). No que diz respeito à apoptose, Frozza et al. (2017) demonstraram que a BRP é capaz de induzir a perda do potencial de membrana em células Hep-2 desencadeando a via mitocondrial intrínseca da apoptose (FROZZA et al., 2017). Com relação à migração celular, ela é o evento celular que permite a geração de metástases (COLAZZO et al., 2014), e as células metastáticas frequentemente desenvolvem resistência aos tratamentos convencionais (BARRETT et al., 2017), por isso a redução da capacidade de migração dessas células mediante o uso da BRP é tão interessante.

O câncer é atualmente uma questão de saúde pública em todo o mundo (SIEGEL et al., 2016), e o número de casos estimados para o ano de 2020, excluindo os cânceres de pele não-melanoma, é de 17 milhões, sendo esperadas mais de 10 milhões de mortes (INCA, 2018). Esses números deixam clara a necessidade de buscar novos compostos terapêuticos para o tratamento e prevenção dos cânceres (FROZZA et al., 2017).

Segundo o último estudo da IARC (*International Agency for Research in Cancer*), nas mulheres o câncer de mama foi o mais frequente em todo o mundo — com exceção do leste da África onde predominou o câncer cervical — e também o que mais ocasionou mortes. Já para os homens, temos o câncer de próstata como mais frequente, seguido do câncer de pulmão e os cânceres de pele não-melanoma. Em mortalidade, o câncer de próstata está em segundo lugar, atrás apenas do câncer de pulmão (FERLAY et al., 2019). Apesar da sua importância, sua detecção precoce permanece controversa, pois a dosagem do PSA (*Prostate Specific antigen*) utilizada como método de triagem apresenta especificidade limitada, por isso ainda é indispensável o exame de toque retal (TOURINHO-BARBOSA et al., 2016) e a investigação de sinais e sintomas clínicos — como dificuldade de urinar, diminuição do jato de urina, necessidade de urinar mais vezes ao dia, e presença de sangue na urina — como uma forma de prevenção secundária que possibilita a detecção precoce do câncer (TOURINHO-BARBOSA et al., 2016; INCA, 2018).

Embora uma parcela dos pacientes obtenha melhora clínica com o uso das terapias convencionais, há aqueles que apresentam recorrência e/ou progressão tumoral pouco tempo depois de receberem os protocolos primários de quimioterapia. Alguns desses pacientes também desenvolvem metástases, o que inviabiliza o

tratamento com intenção curativa, deixando-os restritos às abordagens paliativas. Sobretudo para esses pacientes faz-se necessária uma melhor abordagem terapêutica (UDAGER & TOMLINS, 2018), porém, o tratamento dos cânceres prostáticos avançados é um grande desafio, pois as múltiplas mutações que esses cânceres acumulam contribuem para a resistência aos quimioterápicos, frequentemente resultantes de alterações nos supressores tumorais como PTEN, presente em 60% dos pacientes com câncer prostático (SHEN & ABATE-SHEN, 2007) e aumento da expressão de fatores de sobrevivência celular (como Bcl-2, clAP-1, clAP-2 e survivina) que inibem proteínas das vias celulares ligadas à apoptose (GIBBONS et al., 2000; FELDMAN & FELDMAN, 2010). Begnini et al. (2014) relataram a capacidade da BRP de induzir a apoptose em células de carcinoma de bexiga, da linhagem 5637, pelo aumento da proporção entre as proteínas pró e antiapoptóticas Bax/Bcl-2, e a nível de mRNA das caspases 9, 8 e 3. Outros estudos demonstraram a habilidade especificamente dos polifenóis de aumentar a taxa de apoptose em diferentes linhagens celulares de câncer prostático resistente à ação dos quimioterápicos convencionais (FULDA & DEBATIN 2004; HORINAKA et al., 2006; SHANKAR et al., 2007; SIDDIQUI et al., 2008; TANIGUCHI et al., 2008; SZLISZKA et al., 2009; JUNG et al., 2010; SZLISZKA et al., 2011 b), e a própolis é uma das fontes mais ricas de polifenóis disponíveis na natureza (SZLISZKA et al., 2011 a).

Existem mais de 200 linhagens e sub linhagens celulares de câncer de próstata humano, e LNCaP e PC3 estão entre as mais frequentemente presentes na maioria dos artigos científicos publicados (SOBEL & SADAR, 2005). Essas linhagens podem ser diferenciadas de acordo com sua morfologia celular, classificação histológica da neoplasia gerada, gradação clínica, sítio de metástase e responsividade à ablação androgênica. PC3 é uma linhagem celular neoplásica humana de origem prostática, mas colhida de sítio metastático ósseo, dando origem a um adenocarcinoma de grau IV, portanto, uma neoplasia epitelial (KAIGHN et al., 1979). LNCaP também é uma linhagem celular neoplásica prostática humana, obtida de um carcinoma de sítio metastático linfonodal supraclavicular, positiva para receptores de estrógeno e testosterona (HOROSZEWICZ et al., 1983). Ademais, as células PC3 têm alto potencial metastático em comparação com as células DU145, que têm um potencial metastático moderado, e as células LNCaP, que têm baixo potencial metastático (PULUKURI et al., 2005).

Dado esse contexto da problemática do câncer de próstata e o potencial terapêutico da BRP, este projeto visou avaliar os efeitos de uma amostra de própolis vermelha sobre linhagens de câncer prostático e sobre monócitos humanos, no intuito de explorar suas propriedades biológicas.

2. Justificativa do projeto

Considerando a escassez de trabalhos sobre as atividades biológicas da própolis vermelha e visando explorar o potencial da mesma, investigamos a influência da BRP sobre a viabilidade de linhagens de câncer prostático e também sobre as funções de monócitos humanos obtidos de indivíduos saudáveis. Visto que o tratamento quimioterápico convencional acarreta efeitos colaterais nos pacientes, tais como toxicidade e imunossupressão, é de grande valia a busca de abordagens terapêuticas que minimizem esses efeitos, o que é não só de interesse acadêmico, como também da indústria farmacêutica.

Esta tese é parte do pós-doutorado da Prof^a. Dr^a. Karina Basso Santiago.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

Investigar a ação da BRP sobre linhagens celulares de câncer de próstata (LNCaP e PC3) e sobre monócitos humanos.

3.2. Objetivos específicos:

- ✓ Analisar a composição química da BRP por cromatografia líquida;
- ✓ Analisar a ação da BRP sobre a viabilidade de linhagens celulares de câncer de próstata (LNCaP e PC3) pelo método do MTT;
- ✓ Avaliar o efeito da BRP sobre a viabilidade de monócitos humanos pelo método do MTT;

- ✓ Avaliar o efeito da BRP sobre a expressão de marcadores de superfície celular em monócitos humanos (TLR-2, TLR-4, HLA-DR e CD80) por citometria de fluxo.

4. Material e métodos

4.1. Desenho experimental

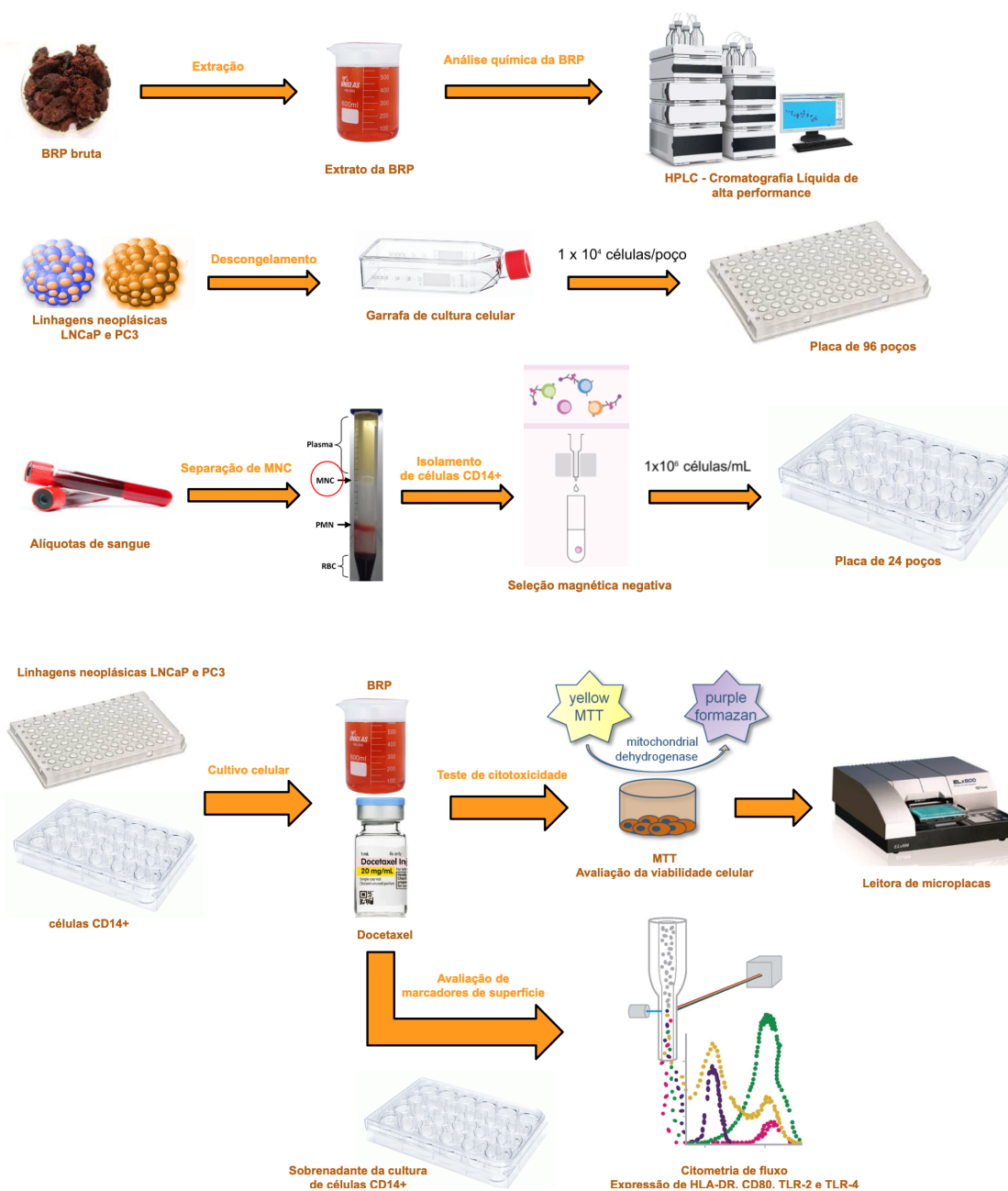


Figura 2. Esquema resumido dos procedimentos experimentais.

4.2 BRP e Docetaxel

A BRP foi coletada em apiários localizados na cidade de Canavieiras, estado da Bahia, Brasil, e analisada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pelo grupo liderado pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos. Foi utilizada a técnica de HPLC-DAD (*high performance liquid chromatography with diode array detection*) em cromatógrafo líquido (Shimadzu ®) equipado com bombas LC-10 Avp, controlador SCL-10 Avp, detector de matriz de diodos SPD-10 Avp e o *software* Classe VP, versão 5.02. Água (A) com ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila (B) foram utilizadas como fase móvel. Um volume de injeção de 20µL foi usado durante toda a análise.

Para aquisição dos dados cromatográficos, o extrato de BRP (1mg/mL) foi submetido à análise cromatográfica em coluna Synergi Polar RP (tamanho de partícula de 4µm, 4,6 × 150mm, Phenomenex®) usando o seguinte gradiente de eluição: 23% (B) → 100% (B) aos 32 minutos (linear), depois 100% (B) aos 34 minutos (linear) e reequilibrado aos 40 minutos com uma taxa de fluxo de 1,2mL/min.

O comprimento de onda da varredura DAD foi ajustado para 190 a 600 nm com 0,64s de taxa de varredura. Para identificação dos picos, os compostos liquiritigenina isolada, isoliquiritigenina, vestitol, neovestitol, medicarpina, 7-O-metilvestitol, gutiferona E, e oblongifolina B foram analisados nas mesmas condições.

Para a preparação do extrato, o material foi macerado em solução hidroalcoólica na proporção 7:3, seguida de percolação a cada três dias. Esse processo foi repetido até que não houvesse mais BRP. As soluções hidroalcoólicas obtidas foram filtradas e evaporadas em evaporador rotativo e depois liofilizadas para obtenção dos extratos hidroalcoólicos brutos. O extrato de BRP foi então diluído para obter as concentrações desejadas.

O medicamento quimioterápico Docetaxel (CAS: 114977-28-5, Fórmula: $C_{43}H_{53}NO_{14}$), foi adquirido da Glenmark Pharmaceuticals Ltda® (São Paulo, Brasil).

4.3 Linhagens celulares neoplásicas prostáticas

As linhagens celulares LNCaP (CVCL_0395) e PC3 (CVCL_0035) foram gentilmente fornecidas pela Prof^a. Dr^a. Flávia Karina Dellela, do Laboratório de matriz extracelular (LabMEC) do Instituto de Biociências (IBB) – UNESP, Campus de Botucatu.

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico Pen Strep a 1% (Thermo Fisher®), e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada e com 5% de CO₂. A avaliação morfológica foi feita diariamente utilizando-se um microscópio invertido com contraste de fase para observação da confluência celular e da viabilidade usando o corante azul de tripano e um hemocitômetro.

4.4 Avaliação da viabilidade celular das linhagens prostáticas

Um total de 1×10^4 células/poço foi adicionado à placa de cultura de 96 poços e após 24 h de adesão, sob privação do SFB a fim de permitir a sincronização do ciclo celular, essas células foram tratadas com BRP nas concentrações de 1, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100 µg/mL e docetaxel a 100 nM/mL por 24, 48 e 72 h.

As concentrações de BRP a serem testadas foi baseadas nos experimentos prévios conduzidos pelo grupo com a própolis e linhagens neoplásicas (WATANABE et al., 2011; FRIÓN-HERRERA et al., 2015; WATANABE et al., 2018). Já a concentração de docetaxel foi definida mediante análise de experimentos realizados com as linhagens tumorais prostáticas LNCaP e PC3 (OGURA et al., 2016; XIAO et al., 2016; SPENCER et al., 2018; GHASEMI et al., 2019; CISSE et al., 2019).

As células incubadas apenas com meio ou com solvente da própolis (etanol 70%) foram utilizadas como controle.

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich®, EUA), cujo princípio é a absorção do sal MTT pelas células viáveis e sua redução por ação das enzimas desidrogenases e redutases, dando origem aos cristais de formazan que são insolúveis.

Após incubação por 24, 48 e 72 h, o sobrenadante da cultura de células foi removido e foram adicionados 100 µL de MTT dissolvidos em meio RPMI completo, seguidos de incubação adicional a 37°C por 3 h. Após esse tempo, o MTT foi removido e 100 µL de DMSO foram adicionados para a solubilização dos cristais de

formazan. Em seguida, a densidade óptica foi lida usando um leitor ELISA de filtro de 540 nm e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas. Os resultados foram expressos em relação às células incubadas somente com meio de cultura, considerado como 100% de viabilidade.

4.5 Monócitos humanos

As amostras de sangue foram obtidas de 5 voluntários saudáveis que assinaram um termo de consentimento para a coleta do material (Anexo 1. Protocolo CEP 3.570.184). Foram aceitos indivíduos maiores de 18 anos, não fumantes, não doentes e sem uso de nenhum medicamento.

Alíquotas de 20 mL foram coletadas dos pacientes e colocadas em tubos estéreis contendo 200 µL de heparina. Posteriormente, as células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cells*- PBMCs) foram obtidas por separação de gradiente Ficoll-Paque Plus® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) por centrifugação, e o anel de células mononucleares foi coletado e lavado duas vezes em meio RPMI mediante centrifugação por 10 min a 200 xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 1 mL de RPMI completo.

Após a contagem das células viáveis utilizando a coloração com solução de azul de tripano a 0,2% e uma câmara de Neubauer, a concentração foi ajustada para 1×10^7 células/mL para o isolamento de células CD14+ através de seleção magnética negativa.

4.6 Isolamento das células CD14+

O isolamento das células CD14+ foi realizado pela técnica de separação magnética negativa. As células foram incubadas com esferas magnéticas acopladas a anticorpos monoclonais contidos no *kit* comercial MACS® *Monocyte Isolation Kit II Human* (Miltenyi Biotec Inc, EUA). Esse *kit* contém coquetéis de anticorpos biotinizados que se ligam especificamente às moléculas alvo, no entanto, o coquetel de isolamento de células CD14+ não contém anticorpos para essa molécula, e as células CD14+ tendem a não serem marcadas pelos anticorpos biotinizados. Essa interação anticorpo-biotina permite que as células marcadas sejam retidas quando

submetidas ao campo magnético da plataforma. Portanto, as células CD14+ não retidas na coluna foram coletadas em tubos e utilizadas nos ensaios.

Após o isolamento, a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células/mL e foram adicionados 500 μ L dessa solução às placas de cultura de 24 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça). Após incubação por 24 h a 37 °C e CO₂ a 5% com BRP nas concentrações 5, 25, 50, 75 μ g/mL, docetaxel na concentração de 100 nM/mL e LPS na concentração de 5 μ g/mL, o sobrenadante foi coletado e as células foram usadas para avaliar sua viabilidade e a expressão de marcadores de superfície.

As concentrações de BRP utilizadas nesta avaliação foram derivadas do teste realizado com as células neoplásicas. Foram selecionadas aquelas concentrações cujos resultados diferiam entre si e dentre as doses utilizadas, eliminando aquelas com resultados pouco significativos.

4.7 Avaliação da viabilidade celular dos monócitos

A viabilidade celular foi avaliada após incubação por 24h pelo teste colorimétrico MTT descrito anteriormente no item 4.3.

4.8 Expressão de marcadores celulares nos monócitos

O citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD Becton Dickinson and Company, EUA) foi utilizado nos ensaios de citometria de fluxo para avaliar a presença dos seguintes marcadores celulares: TLR-2, TLR-4, HLA-DR e CD80.

Um montante de 1×10^6 monócitos/mL (500 μ L) foi colocado em tubos de citômetro de poliestireno e centrifugado por 10 minutos a 465 g. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas a 37°C com BRP. Após 24 h as células foram lavadas, ressuspendidas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II) e incubadas com anticorpos monoclonais fluorescentes específicos.

Após esse período, as células foram separadas em dois grupos (A e B). No grupo A as células estimuladas foram incubadas com anticorpos anti-TLR-2 conjugados com FITC (clone TL2.1 - Biolegend, EUA) e anticorpos anti-TLR-4 conjugados com PE (clone HTA125 - Biolegend, EUA). No grupo B os monócitos foram incubados por 30 minutos no escuro a 4°C, com anti-HLA-DR conjugado com

FITC (clone L243 - Biolegend, EUA), e anti-CD80 conjugado com PE (clone D210 - Biolegend, EUA) anticorpos.

Para cada teste foi incluído um tubo contendo células com controle isotópico dos respectivos fluorocromos. As células foram marcadas com anti-CD14 conjugado com PerCP/Cy5.5 (clone HCD14 - Biolegend, EUA), o que permitiu a seleção apenas do *gate* de monócitos CD14+. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 465 g para lavagem, fixadas em 500 µL de ISOTON II contendo 50 µL de paraformaldeído a 5% e analisadas por citometria de fluxo.

As análises foram realizadas utilizando o *software* CellQuest® para adquirir e analisar multiparâmetros celulares. A aquisição de 30 mil eventos por amostra foi padronizada e a população de interesse foi otimizada através do estabelecimento de parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os resultados foram expressos como uma porcentagem de células positivas para CD14.

4. 9 Análise estatística

Os dados foram analisados com o *software* estatístico Graph Pad® (*Graph Pad Software*, Inc., San Diego, CA, EUA). A análise de variância (ANOVA) e o teste de Dunnett foram utilizados para a análise de todos os parâmetros. Um valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

5. Resultados

5.1. Composição química da própolis

A figura 3 mostra os resultados da HPLC-DAD. Nela, os picos representam a absorvância característica de cada um dos componentes encontrados em predominância na nossa amostra de BRP: (1) liquiritigenina, (2) isoliquiritigenina, (3) vestitol, (4) neovestitol, (5) medicarpina, (6) 7-O-metilvestitol, (7) gutiferona E e (8) oblongifolina B.

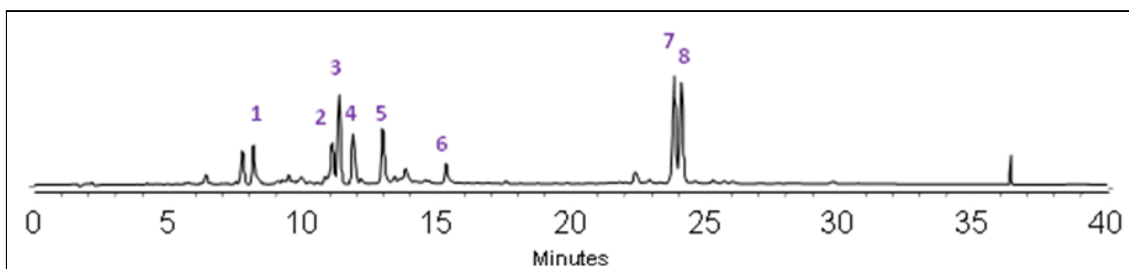


Figura 3. Composição química da própolis vermelha produzida em Canavieiras, Bahia, Brasil, obtida por cromatografia líquida (HPLC-DAD).

5.2. Ensaio citotóxico com as células PC3 e LNCaP

Os resultados de viabilidade expressos nas figuras 4 e 5 correspondem respectivamente às linhagens PC3 e LNCaP.

Com relação às células da linhagem PC3 (Figura 4), logo às 24h as concentrações de 5 µg/mL e 20 µg/mL reduziram a viabilidade para 68,4% e 86,5% , respectivamente. Às 48h destacam-se os resultados das concentrações 25 µg/mL com 68,7%, 10 µg/mL com 80%, 2,5 µg/mL com 83,5% e 50 µg/mL com 84,3%. E às 72h os resultados mais relevantes ocorreram nas concentrações de 25 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente com 65,5%, 84,3% e 84,2%. É possível identificar um efeito tempo-dependente apenas para a concentração de 25 µg/mL. Já o docetaxel, por sua vez, causou uma redução da viabilidade celular da linhagem PC3 para 74%, 73% e 57% respectivamente após 24, 48 e 72h

A linhagem LNCaP (Figura 5) teve sua viabilidade moderadamente afetada pela BRP após as primeiras 24h, sendo as concentrações de 10 e 50 µg/ml responsáveis pelas maiores reduções de viabilidade, respectivamente 53,5% e 51,3%. Entretanto, os efeitos foram mais evidentes às 48h e 72h para aquelas concentrações dentro da faixa de 5 a 100 µg/ml, sendo a redução da viabilidade proporcional à dose e ao tempo de exposição, sobretudo para as doses de 50, 75 e 100 µg/mL. Para a linhagem LNCaP o docetaxel reduziu os percentuais de viabilidade de 67,2% às 24h, para 36% às 48h e chegou a 5,8% às 72h.

A comparação das figuras 4 e 5 evidencia que as células da linhagem PC3 apresentaram maior resistência à ação citotóxica da BRP do que a linhagem LNCaP ao longo de todo o período de exposição. Assim como ocorreu para a BRP, a linhagem LNCaP também mostrou consideravelmente mais suscetível ao docetaxel do que a linhagem PC3.

Por fim, o etanol 70%, solvente da própolis, não afetou significativamente a viabilidade celular em nenhum momento ao longo do período avaliado, exibindo os valores de 89,2% às 24h, 92,4% às 48h e 95,7% às 72h para a linhagem PC3, e 90,7%, 90,9% e 91,8% respectivamente às 24, 48 e 72h.para LNCAP

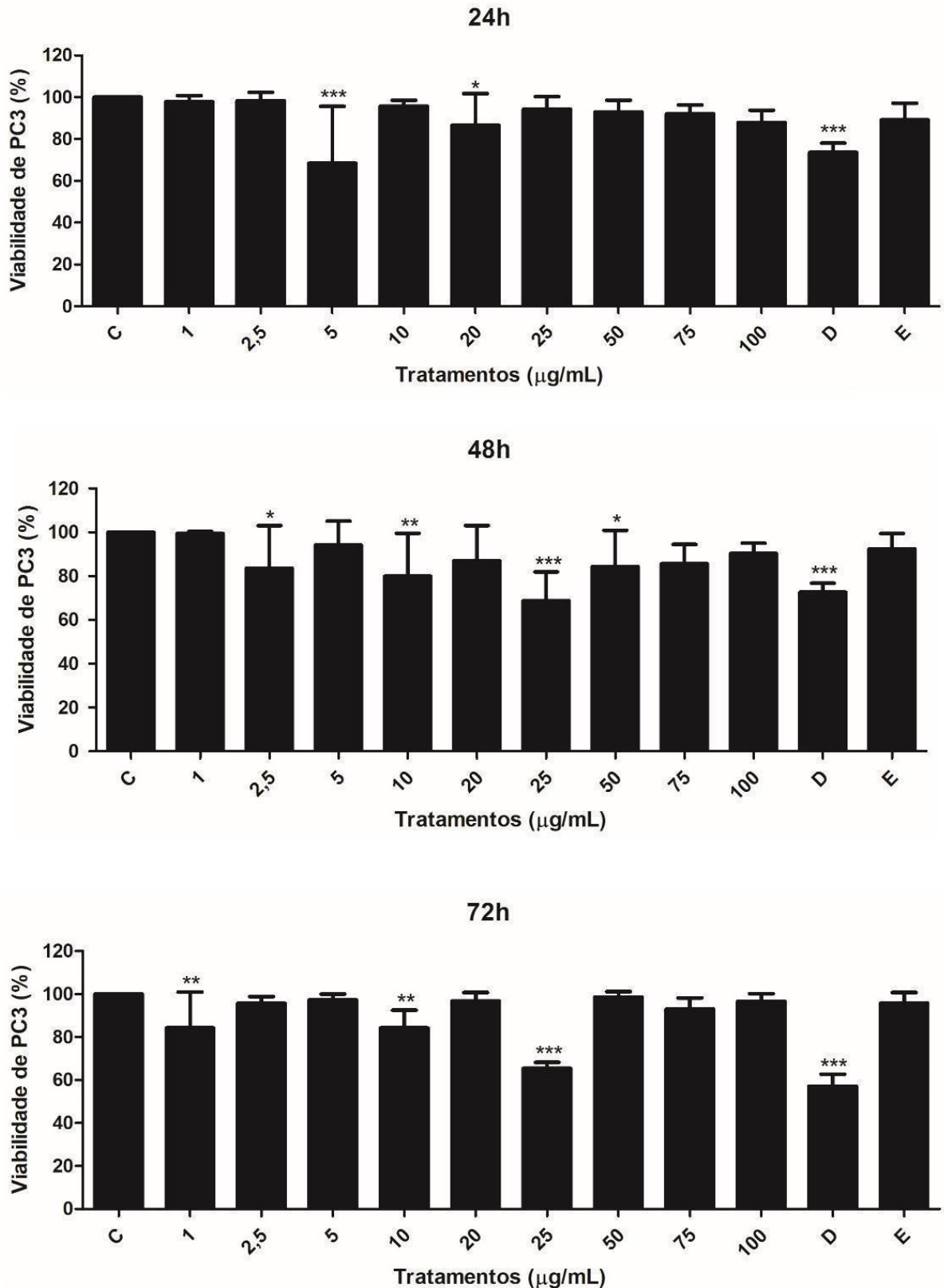


Figure 4. Viabilidade (%) da linhagem PC3 após incubação com meio de cultura apenas (controle – C), própolis vermelhas em diferentes concentrações, docetaxel (D – 100 nM/mL) e o solvente da própolis (E – etanol 70%) ($P < 0,05$). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 em relação ao controle (C).

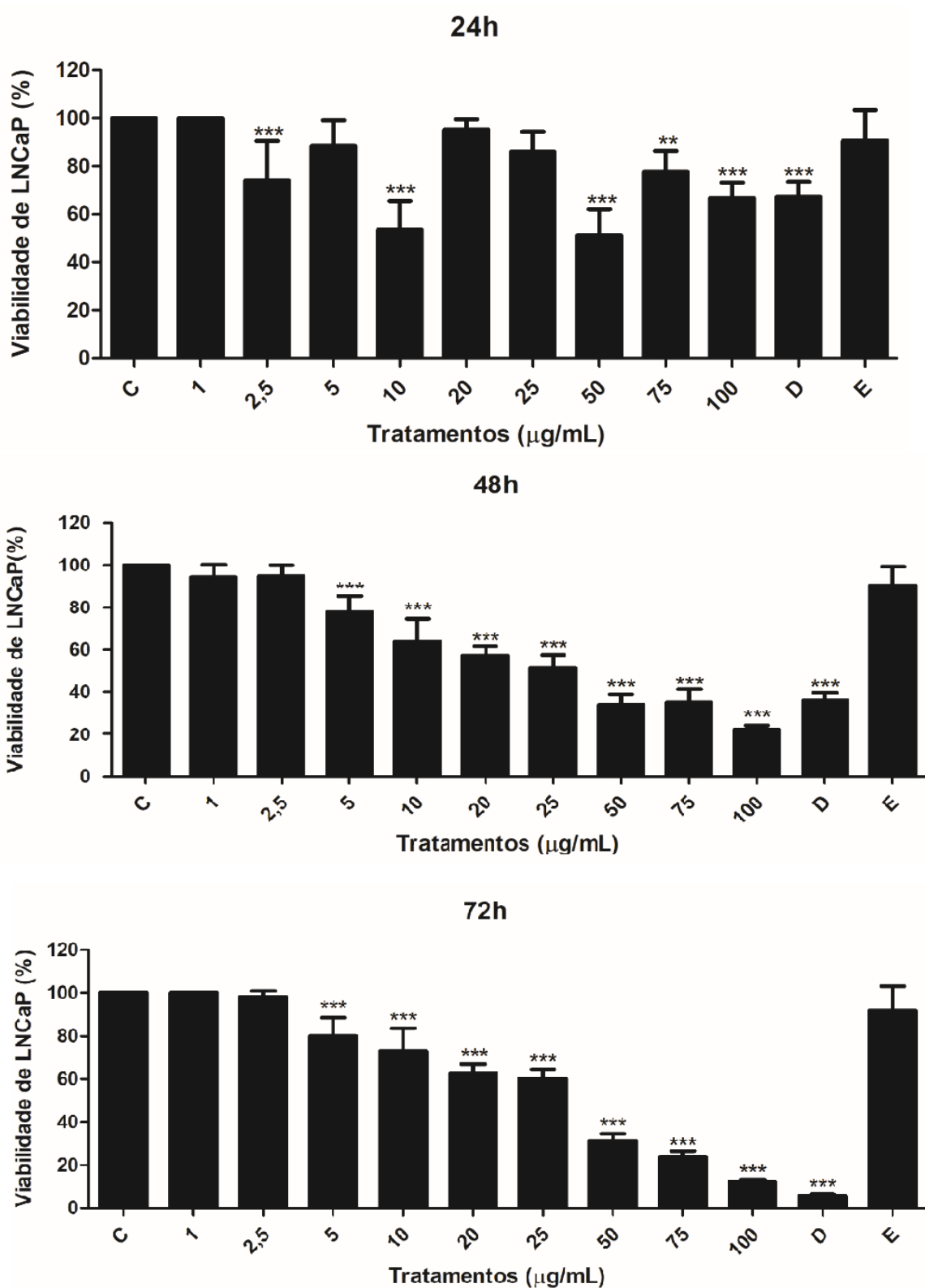


Figura 5. Viabilidade (%) da linhagem LNCaP após incubação com meio de cultura (controle – C), BRP em diferentes concentrações (2, 3.5, 5, 10, 20, 25, 50, 75 e 100µg/ml) , docetaxel (D – 100 nM/mL) e o solvente da própolis (E – etanol 70%) (P < 0,05). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 em relação ao controle (C).

5.3. Efeito da própolis na viabilidade dos monócitos

O efeito da BRP sobre a viabilidade dos monócitos humanos foi obtido em comparação à viabilidade dos monócitos do grupo controle.

Nenhuma das concentrações de BRP afetou a viabilidade celular dos monócitos (Figura 6). O mesmo ocorreu para o solvente da própolis, o etanol 70% (dados não mostrados). Já o docetaxel reduziu a viabilidade dos monócitos em 5%, ao passo que, conforme o esperado, o tratamento dos monócitos com LPS não afetou a viabilidade celular.

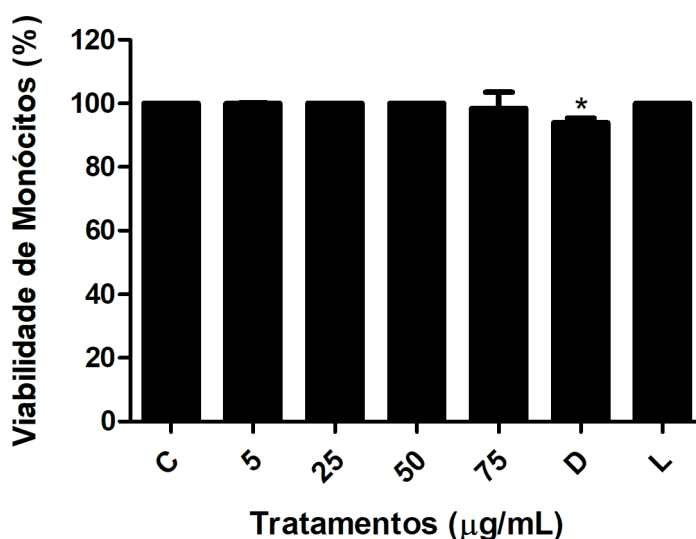


Figura 6. Viabilidade (%) dos monócitos após incubação com meio de cultura (controle – C), BRP em diferentes concentrações (5, 25, 50, 75 µg/ml), docetaxel (D – 100 nM/mL), e LPS (L – 5 µg/mL [P < 0,05]). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 em relação ao controle (C).

5.4. Efeito da própolis na expressão de TLR-2, TLR-4, HLA-DR e CD80 pelos monócitos

A BRP (75 µg/mL) induziu aumento na expressão de CD80 ($p < 0.05$) (Figura 7a); entretanto, não houve diferença significativa nos padrões de expressão de TLR-2 (Figura 7c) e TLR-4 (Figura 7d) em função das diferentes concentrações de BRP.

Já a exposição das células ao docetaxel diminuiu a expressão de HLA-DR (Figura 7b) para 77,4%, em comparação ao controle com 88,9%, e de TLR-4 (Figura 7d), para 8,1% em comparação ao controle com 17%.

O LPS, utilizado como controle positivo, estimulou a expressão tanto de CD80 (Figura 7a) alcançando 35,5% contra 10,8% do controle não-tratado, sendo na expressão relativa esse incremento similar àquele induzido pela BRP (75 µg/mL), quanto de TLR-4 (36,3% - Figura 7d). Já os níveis de expressão de TLR-2 (Figura 7c) e HLA-DR (Figura 7d) não foram alterados pelo tratamento com LPS.

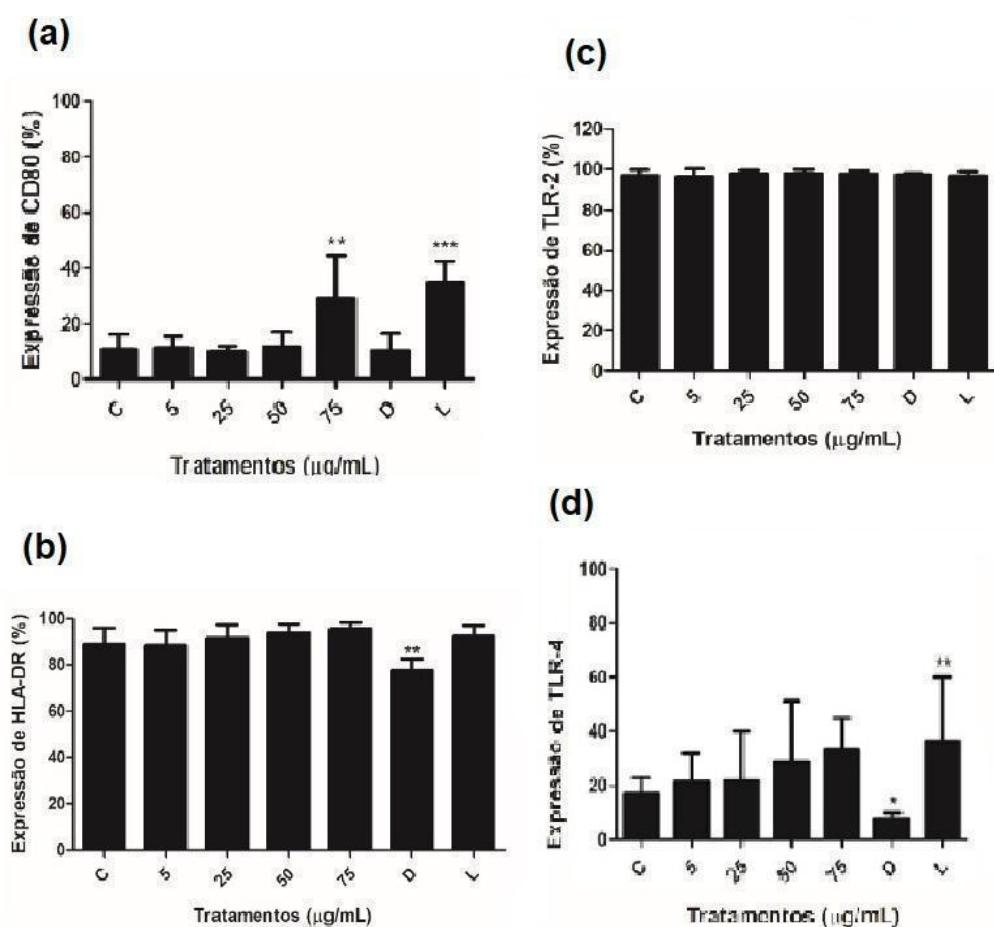


Figura 7. Expressão (%) de CD80 (a), HLA-DR (b), TLR-2 (c) e TLR-4 (d) por monócitos humanos incubados por 24h com meio de cultura (controle – C), própolis vermelha (5, 25, 50 e 75 µg/ml), docetaxel (D – 100 nM/mL) e LPS (L – 5 µg/ml). * P < 0,05 vs. controle (média ± DP; n = 5). Nível de Significância * 0.10, ** 0.05, *** 0.01 com relação ao controle (C).

6. Discussão

A própolis vermelha foi o décimo segundo tipo de própolis catalogada no Brasil (FRANCHIN et al, 2018), e por haver todos esses tipos, a própolis é considerada um dos produtos naturais mais heterogêneos (RIGHI et al., 2013). Por isso a padronização é uma necessidade para a indústria farmacêutica, pois permite que a constituição química e a atividade do produto se mantenham ao longo de todo um ciclo de produção e venda (SENA-LOPES et al., 2018). Assim, antes de dar início aos ensaios biológicos, a composição química da nossa amostra de BRP foi investigada utilizando a cromatografia líquida, que permite a separação, identificação e determinação dos componentes químicos presentes em amostras complexas (GAO et al., 2003, RIJIKE et al., 2006) de acordo com seu peso molecular (SILVA, 2016).

Os resultados revelaram que os principais componentes da nossa amostra de BRP são a liquiritigenina (da classe das flavononas), a isoliquiritigenina (um composto fenólico), o vestitol (uma isoflavona), o neovestitol (um isoflavonóide), a medicarpina (um pterocarpano, derivado dos flavonóides), o 7-O-metilvestitol (um isoflavonóide), a gutiferona E, e a oblongifolina B (ambas pertencentes à classe das benzofenonas).

A composição química da própolis está diretamente relacionada ao ecossistema e à biodiversidade da região onde as abelhas coletam as substâncias para a sua produção (CABRAL et al., 2009). Na litoral da Bahia, onde se localiza a cidade de Canavieiras de onde provém nossa amostra de BRP, é comum a presença da *D. ecastophyllum* (QUEIROZ, 2012), a qual identificamos como fonte botânica da nossa amostra haja vista a semelhança com o perfil químico dessa planta já descrito previamente em outros trabalhos (SAHA et a., 2013; CCANA-CCAPATINTA et al., 2020).

A liquiritigenina foi identificada dentre os componentes predominantes também de outras amostras de BRP coletadas nos estados de Sergipe, Alagoas, Paraíba, Espírito Santo e Santa Catarina (SILVA et al.; 2008; LÓPEZ et al., 2014). Além disso, a capacidade antioxidante da própolis vermelha (MATOS et al., 2014; DO NASCIMENTO et al., 2016) pode ser atribuída à isoliquiritigenina que apresentou a melhor atividade antioxidante dos compostos da BRP avaliados no trabalho de Lopez et al. (2017). Já o 7-O-metilvestitol, também predominante na nossa amostra,

demonstrou baixa atividade antioxidante no mesmo estudo. A isoliquiritigenina também apresentou atividade citotóxica contra as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (PENG et al., 2016). Para as gutiferas também foi descrito potencial antitumoral e antineoplásico (DE MENDONÇA et al., 2015), e Arruda et al. (2018) afirmam que quanto maior a incidência solar e a temperatura, maior é a concentração das gutiferas (ARRUDA, 2018), uma observação interessante para o Brasil, um país de clima tropical e com alta incidência solar ao longo do ano todo. As benzofenonas, gutiferona E e a oblongifolina, também estão presentes na composição de amostras de BRP do estado de Alagoas, de Cuba (PICCINELLI et al., 2011) e do estado do Amazonas (ISHIDA et al. 2011).

Esses dados comprovam que amostras de BRP de outras regiões do Brasil, e também de Cuba, possuem similaridades entre elas devido à presença da *D. Ecastophyllum* nessas regiões (SILVA et al.; 2008; PICCINELLI et al., 2011; LÓPEZ et al., 2014).

Dentre os componentes predominantes na nossa amostra de BRP prevalecem os compostos fenólicos, que possuem em sua constituição molecular um ou mais grupamentos hidroxílicos (O-H) ou metoxílicos (C3OH) que lhes conferem capacidade antioxidante e portanto potencial uso no tratamento dos cânceres, já que o dano oxidativo ao material genético celular é um possível fator iniciador e mantenedor da carcinogênese (BRAVO et al., 1998). Essas capacidades antioxidantes estão relatadas particularmente para a liquiritigenina e o metilvestitol (LOPEZ et al., 2017) presentes na nossa amostra.

A BRP é de fato rica em compostos fenólicos (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011) e em algumas amostras, como a nossa e a do estado de Alagoas, os isoflavonóides como flavonas, flavononas, isoflavonas e flavonóis prevalecem sobre os outros componentes (SILVA et al., 2008; REGUEIRA NETO et al., 2017). A mesma predominância foi observada por Righi et al. (2011) trabalhando com a BRP da cidade de Maceió, também no estado de Alagoas como SILVA et al. (2008). Dentre os flavonóides em maior quantidade estavam as chalconas, as isoflavonas, o (3S)-Vestitol e (3S)-7-O-metilvestitol, e medicarpina. Resultado semelhante foi observado em uma amostra de BRP coletada no sul do estado da Paraíba, na qual predominaram isoflavonóides, isoflavonas, flavanonas e flavonóides (AWALE et al., 2008). Integrantes de todos esses grupos químicos estão presentes também na nossa amostra, e esse predomínio de compostos fenólicos, dentre os quais se

destacam frequentemente os flavonóides, pôde ser visto também em amostras de outros países como México, Cuba e Venezuela (TRUSHEVA et al., 2004; CAMPO FERNÁNDEZ, et al., 2008; LOTTI et al., 2010; PICCINELLI et al., 2011), o que comprova que amostras de locais diferentes para as quais foram descritas outras fontes botânicas, sendo a *D. ecastophyllum* para o Brasil; *Clusia scrobiculata*, *Clusia minor* e *Clusia major* para a Venezuela (TOMÁS-BARBERAN et al., 1993; TRUSHEVA et al., 2004; TRUSHEVA, et al., 2006); e *Clusia rosea* para a própolis vermelha de origem cubana (CUESTA-RUBIO et al., 2002) podem compartilhar componentes e funções (DABAS et al., 2019; JUNG et al., 2019; KHOO et al., 2019).

Os flavonóides são as principais substâncias responsáveis pelas atividades antitumoral (DE CARVALHO et al., 2020), antioxidante (REN et al., 2003, WANG et al., 2008; FIRUZI et al., 2013), citotóxica (FIRUZI et al., 2013), citoprotetora, anti-inflamatória (WANG et al., 2008), hepatoprotetora, nefroprotetora e cardioprotetora (REN et al., 2003) apresentadas pelas amostras de própolis vermelha. Muitos desses compostos fenólicos são considerados fitoestrógenos e também fitoesteróis, e ambos já foram identificados em amostras de própolis (LOPEZ et al., 2017), e se dividem em grupo de compostos como as chalconas e os flavonóides (ABIDI, 2001; SIROTKIN & HARRATH, 2014), ambos presentes na nossa amostra de BRP e também naquelas dos estados de Alagoas, Bahia e Paraíba (LOPEZ et al. (2017). Os fitoesteróis por serem precursores da síntese hormonal nos seres humanos e atuarem como antioxidantes (ABIDI, 2001), podem atuar na prevenção dos cânceres (OSTLUND, 2002; BRADFORD & AWAD, 2007; FERNANDES & CABRAL, 2007).

A ação da própolis e dos seus compostos como os flavonóides contra células tumorais vem sendo relatada ao longo das últimas décadas em relação às linhagens prostáticas (WATANABE et al., 2011; ZINGUE et al., 2020, BANZATO et al., 2020). Moraes et al. (2010) compararam os efeitos das própolis brasileiras verde (*B. dracunculifolia*) e vermelha (*D. ecastophyllum*) em duas linhagens celulares prostáticas humanas, sendo uma neoplásica (RC-58T/h/SA#4) e outra normal (PrEC), e reportaram para a linhagem neoplásica uma diminuição de 50% da viabilidade após 48h com concentrações de 2,75 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente para as própolis vermelha e verde, concluindo que a própolis vermelha possui um efeito inibitório maior que o da própolis verde. Além disso, o efeito da própolis vermelha também se mostrou mais pronunciado na linhagem neoplásica em

comparação à linhagem normal. Skjøth e Issinger (2006) analisaram a ação da BRP em quatro linhagens celulares prostáticas neoplásicas (DU-145, PC-3, LNCaP e 22RV1), e foi neste estudo que nos baseamos para a escolha das linhagens LNCaP e PC3 para o presente trabalho, já que os resultados as apontaram como bons modelos experimentais para análise de efeitos e mecanismos de ação de agentes quimioterápicos.

Quanto à viabilidade celular, nas células da linhagem PC3 (Figura 4) foi possível identificar um efeito tempo-dependente para a concentração de 25 µg/mL, já a linhagem LNCaP (Figura 5) teve os efeitos mais evidentes às 48h e 72h para aquelas concentrações dentro da faixa de 5 a 100 µg/mL, sendo a redução da viabilidade proporcional à dose e ao tempo de exposição, sobretudo para as doses de 50, 75 e 100 µg/mL. Nós não encontramos na literatura estudos que expliquem porque a PC3 demonstrou-se mais resistente que LNCaP à ação da BRP ou outras própolis. Entretanto, há relatos comparativos entre as duas linhagens frente ao uso do docetaxel, por isso retomaremos essa questão adiante nessa discussão.

Turan et al. (2015) avaliaram o efeito citotóxico da própolis turca na linhagem PC3 e outras quatro diferentes linhagens de células neoplásicas (carcinoma hepatocelular (HepG2), adenocarcinoma de colon (WiDr), adenocarcinoma cervical (HeLa) e adenocarcinoma mamário (MCF-7)), e após 72h a concentração de 20,7 µg/mL foi capaz de reduzir a viabilidade da linhagem PC3 em 50%, e tal efeito se aproxima daquele que obtivemos com a mesma linhagem às 72h utilizando 25 µg/mL de BRP. Os autores também relatam um IC50 de 20 µg/mL, às 72h, e nos nossos experimentos nessas mesmas condições a linhagem atingiu 100% de viabilidade. Vale ressaltar que a composição química das própolis verde turca e da BRP são diferentes (POPOVA et al., 2005), o que explica parcialmente a diferença dos resultados obtidos. Embora os autores não definam a origem botânica da amostra, eles salientam uma elevada porcentagem de flavonóides e polifenóis, sem discriminar também quais são. Salim et al. (2015) também trabalharam com a linhagem PC3, mas utilizando-se da própolis egípcia, e após 72h os autores notaram alterações morfológicas celulares (redução gradual do tamanho, arredondamento e encolhimento, descolamento da superfície dos frascos de cultura de tecidos e ruptura celular) compatíveis com um efeito citotóxico e indução da apoptose.

O aumento na viabilidade celular mediante a exposição à própolis, como obtivemos para ambas as linhagens neoplásicas em momentos e concentrações

variadas (Figuras 4 e 5), já foram observadas por Kuntz et al. (1999) e De Mendonça et al. (2015). Ambos os autores apontam para um efeito citoprotetor devido às propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos da própolis verde (KUNTZ et al., 1999) e do extrato etanólico da BRP (DE MENDONÇA et al., 2015). A nossa amostra de própolis apresenta de fato um predomínio de compostos com pronunciada atividade antioxidante como o metivestitol e o liquiritigenina (LOPEZ et al., 2017), justificando a possibilidade de observação desse efeito; e Wang et al. (2008) comentam que o efeito citoprotetor dos compostos fenólicos é diretamente proporcional à lipofilicidade dessas moléculas, que favorece sua interação com a bicamada lipídica das células, tanto da membrana celular quanto nuclear, e sua ação como antioxidante.

De Mendonça et al. (2015) relatam que, após 72h de incubação das células das linhagens SF-295, OVCAR-8 e HCT-116 com extrato etanólico da BRP nas concentrações de 0,09 e 12,5µg/mL, houve proliferação celular, ainda que discretamente e de maneira não significativa em relação ao grupo controle. Já na concentração de 50 µg/mL houve atividade citotóxica em todas essas linhagens, provando que a ação da própolis depende da concentração na qual ela é utilizada. Entretanto, não é possível prever a ação citoprotetora, ou inibidora da proliferação celular e indutora da apoptose baseada na composição química e estrutura dos flavonóides. Na verdade essas atividades decorrem de interações complexas e podem ser influenciadas até pela quantidade de oxigênio dissolvido no sistema que está sendo analisado. Também não há correlação entre suas propriedades antioxidantes e a indução da apoptose ou parada do ciclo celular (KUNTZ et al., 1999).

Nossos resultados obtidos com a linhagem LNCaP são superiores àqueles obtido nos dois estudos realizados por Szliszka et al. (2011a, 2011b) que, trabalhando com duas amostras de própolis verde de origens distintas observaram para a própolis brasileira às 48h efeito citotóxico na linhagem LNCaP de 3 e 8% respectivamente para as concentrações de 20 e 50 µg/mL, e para a própolis polonesa na concentração de 50 µg/mL a citotoxicidade foi de 24%. Já os nossos resultados para as concentrações de 20 e 50 µg/mL foram 43 e 66% de citotoxicidade. O único trabalho que encontramos acerca do efeito da BRP sobre a linhagem foi o de Kamiya et al. (2012), comparando o efeito das própolis chinesa, verde brasileira e BRP na viabilidade de quatro linhagens celulares (carcinoma

mamário (MCF-7), fibroblastos humanos, carcinoma prostático (LNCaP) e carcinoma mamário (ZR-75-1)). Ambas as própolis brasileiras demonstraram efeito superior à própolis chinesa, mas exibiram resultados estatisticamente iguais entre si. Embora os autores não tenham fornecido os valores numéricos para a viabilidade, é possível identificar graficamente que nosso resultado obtido com a concentração de 10µg/mL às 24h foi superior. O autor sugere que o efeito apoptótico das três amostras de própolis pode estar associado à interação do produto com os receptores de estrógeno, fato já relatado por Popolo et al., (2009) cujo estudo com a própolis argelina demonstra maior taxa apoptótica da linhagem celular neoplásica que expressa receptores de estrógeno (MCF-7) em comparação àquela que não expressa (MDA-MB-231). Essa diferença de responsividade ao estrógeno pode ser também vista nas linhagens prostáticas que se mostram progressivamente independentes a ele ao adquirirem mais características de malignidade (BOSLAND, 2005), como ocorre na comparação entre as linhagens LNCaP e PC3, respectivamente. Zabaïou et al. (2019) também demonstraram o efeito anti-androgênico da própolis nas células LNCaP afetando genes relacionados à proliferação celular, induzindo as células à parada do ciclo celular e consequente apoptose; o que provavelmente não ocorreria na linhagem PC3 que é resistente à ablação androgênica. Essas diferenças também justificam a diferença de resultados que obtivemos entre as duas linhagens.

No que diz respeito à relação dose-dependente ela ocorre apenas para a linhagem LNCaP (Figura 5), e foi observada também nos trabalhos publicados por Szliszka et al. (2009, 2011a, 2011b) ao trabalharem com as linhagens celulares de próstata (DU145 e LNCaP) frente às própolis de origem brasileira e polonesa (de origens botânicas variadas, porém, nenhuma classificada como própolis vermelha). . Embora essa ação tempo ou dose-dependente da própolis seja comumente relatada na literatura, não a encontramos descrita para a linhagem PC3.

Assim como para a BRP, o docetaxel também foi capaz de reduzir o percentual de viabilidade celular da linhagem LNCaP de maneira tempo-dependente, enquanto a linhagem PC3 novamente se mostrou mais resistente.

Catz e Johnson (2003) destacam que os mecanismos de resistência, variam de acordo com o quimioterápico testado, pois eles agem de maneiras diversas, e o mecanismo de ação do docetaxel consiste na sua ligação à proteína beta-tubulina que compõem os microtúbulos do citoesqueleto das células, causando sua

estabilização, o que leva à parada da divisão celular, e subsequentemente à apoptose (CHAN et al., 2005). Como a linhagem PC3 não expressa o gene da P53, ela apresenta maiores níveis de expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2, p21, p16, e conseqüentemente maior resistência à apoptose. Ao que se soma o efeito da expressão do gene SIRT1 (*Silent mating type information regulation 2 homolog 1*) (CHU et al., 2005, KOJIMA et al., 2008) que promove a desacetilação dos genes responsáveis pelos supressores tumores tumorais p53 e NF-kB, impedindo sua tradução (MICHAN & SINCLAIR, 2007). E mais recentemente demonstrou-se também a importância dos microRNAs miR-21, miR-199a e miR140, na resistência quimioterápica da PC3 (FUJITA et al., 2008; CHEN et al., 2008; SONG et al., 2009; SHI et al., 2010). Essa resistência à apoptose também pode ser um dos motivos que explica os resultados de viabilidade obtidos com a BRP por nós, já que a indução da apoptose é um dos mecanismo mais frequentemente descritos para a BRP (FROZZA et al., 2007; BEGNINI et al., 2014), conforme já abordamos anteriormente.

A resistência medicamentosa, particularmente em relação aos quimioterápicos (HEMAISWARYA & DOUBLE, 2006), é um tema para o qual a Organização Mundial da Saúde já manifestou sua preocupação (OMS, 2017), mas outro ponto negativo do uso dos quimioterápicos convencionais é o mau prognóstico gerado devido aos efeitos colaterais (MATOS et al., 2012), uma vez que a quimioterapia afeta também as células normais com alta atividade mitótica e um ciclo celular curto, como as que compõem o tecido hematopoiético (medula óssea) (ANDRADE & SILVA, 2007). A toxicidade é a principal desvantagem dos quimioterápicos (DEVITA & CHU, 2008) e pode apresentar-se dentro de poucas horas, dias, meses ou até mesmo anos após a sua administração. Portanto, para avaliar a resposta clínica a um agente quimioterápico deve-se levar em conta também a contagem das células sanguíneas (das séries branca e vermelha, e também os trombócitos) (ANDRADE & SILVA, 2007), já que a presença de infecções no paciente oncológico é considerada contra-indicação absoluta para o início ou continuidade do protocolo terapêutico, e é fato que a diminuição dos elementos figurados do sangue aumenta a chance dessas infecções ocorrerem (BENDER, 2002; DEVITA & CHU, 2008).

Das células do sistema imune nós optamos por avaliar os monócitos, dada a sua importância para a resposta imune pela capacidade de reconhecer PAMPs e DAMPs via Receptores de reconhecimento de padrões ou RRP (do inglês *Pattern*

recognition receptors ou PRRs). Essas células podem fagocitar e apresentar antígenos, secretar citocinas e se proliferar em resposta à injúria tecidual, que pode ter origem inclusive no processo neoplásico que ocasiona desbalanços no microambiente tecidual, morte do tecido saudável, inflamação e até necrose (CHIU & BHARAT, 2017). No nosso estudo o docetaxel causou um decréscimo na viabilidade dos monócitos de apenas 5%, entretanto, vale ressaltar que os monócitos geralmente não se proliferam *in vitro*, a não ser que condições especiais sejam oferecidas (SWIRSKI et al., 2014), como a co-cultura e adição de fatores estimulantes como o fator estimulador de colônias de macrófago (G-MCS) e outras citocinas com interleucinas 1, 3 e 6 (KADOI, 2011). Portanto, é esperado que o docetaxel não haja nessas células. Evidentemente em experimentos *in vivo* os resultados são diferentes, Sato et al. (2012) demonstraram que a monoterapia com docetaxel em pacientes com neoplasias variadas, dentre as quais as prostáticas, é indutora de neutropenia em diversos graus; e que a monopenia precede a neutropenia. A contagem dos monócitos é, portanto, um fator preditivo também de mau prognóstico e indicador de inflamação sistêmica (SHIGETA et al., 2016).

Com relação à BRP, em todas as concentrações testadas em nossos experimentos, nenhum efeito na viabilidade dos monócitos foi observado, assim como ocorreu nos trabalhos de outros autores que também utilizaram a BRP e a própolis verde e avaliaram seus efeitos sobre os monócitos humanos (BUENO-SILVA et al., 2015; CONTI et al., 2015; SANTIAGO et al., 2016), tanto em concentrações inferiores às aqui testadas (0,2; 1,0; 2,0 (SANTIAGO et al., 2016)) quanto igual à nossa concentração máxima de 100 µg/mL (BUENO-SILVA et al., 2015; CONTI et al., 2015). Ao migrarem da circulação para os tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos e células dendríticas. Além da função fagocitária os macrófagos também secretam citocinas para recrutar outras células do sistema imune, e podem migrar para os linfonodos para fazer a apresentação de antígenos para as células T (CHIU & BHARAT, 2016). Por isso, Xool-Tamayo et al. (2020) também avaliaram a viabilidade de macrófagos peritoneais de ratos tratados com a própolis (origem não especificada) e ela não foi afetada, fazendo da própolis uma opção mais viável para compôr os protocolos antineoplásicos, evitando a grande desvantagem da mielotoxicidade e consequente impacto na imunidade dos pacientes.

O efeito imunomodulador da própolis se deve principalmente à sua ação nos monócitos e nos seus receptores responsáveis pelo reconhecimento dos DAMPS e dos PAMPS, como os TLRs (SFORCIN et al., 2007), e a expressão da proteína HLA-DR na superfície do monócitos juntamente com o antígeno, como aqueles que as células neoplásicas expressam, a ser apresentado pelas células T é fundamental para o seu reconhecimento e proliferação dessas células (BUFALO et al, 2014). HLA-DR é o produto mais frequentemente expresso pelos monócitos dentre todos os MHC (*Major histocompatibility complex*) de classe II, e o decréscimo na sua expressão está associado à imunossupressão [CHEADLE et al., 1991]. O HLA-DR (SKRZECZYNSKA-MONCZNIK et al., 2008) também é responsável pela apresentação do CD80, um coestimulador da ativação de células T (BARTON & MEDZHITOV, 2003; PALM & MEDZHITOV, 2009) que também participam da resposta imune aos cânceres (CHEN & MELLMAN, 2013). Por isso mesmo, optamos por avaliar em nosso trabalho a expressão de TLR-2, TLR-4, CD80 e HLA-DR pelos monócitos.

No nosso trabalho, o tratamento com a BRP induziu à manutenção da taxa de expressão de TLR-2 e TLR-4, já o docetaxel diminuiu a expressão de TLR-4 ($p < 0.1$), ambos em comparação ao grupo controle. Bueno-Silva et al. (2015) reportaram uma diminuição na expressão dos genes relacionados aos TLRs 2 e 4 (sendo eles Cd14, Elk1, Pik3cg, Tirap e TL-4) em macrófagos tratados com a BRP, atenuando a resposta inflamatória induzida pela exposição dos macrófagos ao LPS. Os autores demonstraram que esse potencial antiinflamatório da BRP se deve à sua capacidade de diminuir a transcrição dos genes ou inibir as vias celulares relacionadas à indução da resposta inflamatória nos macrófagos (PI3K, AKT, MAPK, além dos receptores TLR e CD14+). Eles também destacam que esse perfil antiinflamatório pode se dever à presença dominante de componentes como o neovestitol, que também está presente na nossa amostra de BRP. Já Orsatti et al. (2010) reportaram aumento na expressão de ambos TLRs 2 e 4 em macrófagos de camundongos tratados com a própolis verde. Esses resultados opostos mais uma vez endossam o caráter variável de ação da própolis. Segundo Bufalo et al. (2014) os componentes da própolis podem interagir tanto com TL-2 quanto com TL-4, disparando a ativação de fatores como NF- κ B e AP-1, que induzem a expressão dos genes responsáveis pela produção de citocinas e outros mediadores químicos da resposta imunológica como IL-1 β and IL-6, comprovando sua capacidade de dar início e influenciar a

resposta imune. Por isso consideramos que a manutenção da taxa de expressão de receptores é um resultado positivo para a resposta aos cânceres.

Quanto à expressão de CD80, a BRP na concentração de 75 µg/mL induziu um aumento de 18% ($p < 0.05$) da sua expressão em comparação ao grupo controle. Búfalo et al. (2014) também reportaram um aumento na expressão de CD80 pelos monócitos após o tratamento com a própolis verde (100 µg/ml) e também com o ácido cafeico, um derivado fenólico da própolis (BÚFALO & SFORCIN et al., 2015). Diferentemente desses resultados, Conti et al. (2013), trabalhando com outro componente fenólico da própolis verde, o ácido cinâmico, reportaram uma diminuição da expressão de CD80 pelos monócitos. Assim como os três trabalhos citados, nós também propomos que esse aumento no CD80 favorece o reconhecimento de patógenos e a ativação das células T, pois CD80 é a molécula coestimuladora mais importante para a ativação dessas células que são fundamentais no reconhecimento de antígenos expressos por células neoplásicas (UVEBRANT, 2007). Recentemente, Horn et al. (2018) demonstraram *in vivo* a possibilidade do uso terapêutico de uma apresentação solúvel do CD80 (CD80-FC) em pacientes oncológicos devido à capacidade ambivalente dessa molécula em simultaneamente inibir PDL-1 e ativar as células T mediante CD28. A expressão do ligante PDL-1 é uma das maneiras pela qual as células neoplásicas escapam ao sistema imune, por induzirem apoptose e anergia nas células T (KEIR et al., 2008). O CD28 também é expresso pelas células T, provê sinais co-estimulatórios para ativação e sobrevivência dessas células, e também é um receptor para o CD80. Os autores reportam ainda que a administração do CD80-FC aumenta a ativação das células T no microambiente tumoral e aumenta a sobrevivência das cobaias, mesmo naqueles cujos tumores já estão grandes e bem estabelecidos.

No nosso estudo a própolis também manteve os níveis de expressão de HLA-DR, já o docetaxel diminuiu a expressão de HLA-DR ($p < 0.05$). Bufalo et al. (2014), Conti et al. (2016) e Santiago et al. (2016) também reportaram a manutenção da expressão de HLA-DR nos monócitos tratados com a própolis nas concentrações de 5 a 100 µg/mL. O HLA-DR é uma molécula crucial na apresentação antigênica, e sua expressão nos monócitos é considerada um marcador de imunocompetência do hospedeiro, já a diminuição da sua expressão é uma alteração característica de pacientes doentes (TILLINGER et al., 2014). Em pacientes com melanoma, Ugurel et al. (2004) observaram uma diminuição da expressão de HLA-DR associada à

progressão da doença, pois ele reflete uma ineficácia da apresentação de antígenos, dificultando a resposta imune específica, por exemplo a um antígeno tumoral. No mesmo ano, Luczynski et al. (2004) também reportaram uma diminuição da expressão de HLA-DR nos monócitos do sangue periférico de pacientes com neoplasias variadas (leucemia linfoblástica aguda, de linfoma Hodgkin e não-Hodgkin, neuroblastoma, tumor de Wilms, osteosarcoma, histiocitose de células de Langerhans e rabdomyosarcoma) no momento do diagnóstico, após a remissão, durante o tratamento e um ano após o fim da terapêutica oncológica. Os autores também apontam que uma menor contagem de monócitos ativados é responsável pelo déficit na resposta imune facilitando a evasão das células neoplásicas. Por isso consideramos positiva para a função de imunomodulação a manutenção do nível de expressão dessa proteína.

7. Conclusão

Nossa amostra de BRP apresentou um predomínio de compostos fenólicos na sua composição química que lhe confere os efeitos citotóxicos sobre as linhagens neoplásicas e imunomodulador nos monócitos humanos. Além disso, algumas concentrações da própolis foram tão efetivas quanto o docetaxel na redução da viabilidade celular das linhagens neoplásicas. Esses achados em conjunto fazem da BRP um composto promissor para novos estudos na área da terapia oncológica.

8. Referências bibliográficas

Abidi SL. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J Chromatogr A*. 23 de novembro de 2001;935(1–2):173–201.

Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol*. 5 de setembro de 2007;113(2):278–83.

Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*. novembro de 2019;26(7):1695–703.

Arruda RE dos S. Efeito da sazonalidade na composição química e atividades antimicrobiana, antioxidante e tripanossomicida de extratos brutos de própolis vermelha de Alagoas. Effect of seasonality in chemical composition and activities antimicrobial, antioxidant and tripanosomicide of gross extracts of red propolis of Alagoas [Internet]. 29 de novembro de 2018 [citado 17 de dezembro de 2020]; Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/5565>

Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem*. 1º de janeiro de 2008;16(1):181–9.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*. 22 de agosto de 2005;100(1–2):114–7.

Banzato TP, Gubiani JR, Bernardi DI, Nogueira CR, Monteiro AF, Juliano FF, et al. Antiproliferative Flavanoid Dimers Isolated from Brazilian Red Propolis. *J Nat Prod*. 26 de junho de 2020;83(6):1784–93.

Barлак Y, Değer O, Çolak M, Karataylı SC, Bozdayı AM, Yücesan F. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Sci*. 7 de dezembro de 2011;9:74.

Barrett CSX, Millena AC, Khan SA. TGF- β Effects on Prostate Cancer Cell Migration and Invasion Require FosB. *Prostate*. janeiro de 2017;77(1):72–81.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 23 de janeiro de 2004;116(2):281–97.

Begnini KR, Moura de Leon PM, Thurow H, Schultze E, Campos VF, Martins Rodrigues F, et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:639856.

Bosland MC. The role of estrogens in prostate carcinogenesis: a rationale for chemoprevention. *Rev Urol*. 2005;7 Suppl 3:S4–10.

Bradford PG, Awad AB. Phytosterols as anticancer compounds. *Mol Nutr Food Res*. fevereiro de 2007;51(2):161–70.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. novembro de 1998;56(11):317–33.

Bueno-Silva B. Caracterização da propolis vermelha : sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. Characterization of red propolis : its botanical origin and the seasonal effect on its chemical composition and biological activity [Internet]. 2008 [citado 17 de dezembro de 2020]; Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/288530>

Búfalo MC, Bordon-Graciani AP, Conti BJ, de Assis Golim M, Sforcin JM. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J Pharm Pharmacol*. outubro de 2014;66(10):1497–504.

Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM de, Ikegaki M, et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*. 2009;32(6):1523–7.

Campo Fernández M, Cuesta-Rubio O, Rosado Perez A, Montes De Oca Porto R, Márquez Hernández I, Piccinelli AL, et al. GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *J Agric Food Chem*. 12 de novembro de 2008;56(21):9927–32.

Cardoso E de O, Conti BJ, Santiago KB, Conte FL, Oliveira LPG, Hernandes RT, et al. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. *J Pharm Pharmacol*. janeiro de 2017;69(1):99–108.

Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. novembro de 2002;73 Suppl 1:S1-6.

Catz SD, Johnson JL. BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis*. janeiro de 2003;8(1):29–37.

Ccana-Ccapatinta GV, Mejía JAA, Tanimoto MH, Groppo M, Carvalho JCAS de, Bastos JK. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. *Molecules*. 28 de abril de 2020;25(9).

Chai JG, Vendetti S, Bartok I, Schoendorf D, Takacs K, Elliott J, et al. Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J Immunol*. 1º de agosto de 1999;163(3):1298–305.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 15 de julho de 2005;65(14):6029–33.

Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Kelly MG, Fest S, Visintin I, et al. Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells. *Oncogene*. 7 de agosto de 2008;27(34):4712–23.

Chu F, Chou PM, Zheng X, Mirkin BL, Rebbaa A. Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1*. *Cancer Res*. 15 de novembro de 2005;65(22):10183–7.

Cisse O, Quraishi M, Gulluni F, Guffanti F, Mavrommati I, Suthanthirakumaran M, et al. Downregulation of class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2β delays cell division and potentiates the effect of docetaxel on cancer cell growth. *J Exp Clin Cancer Res*. 21 de novembro de 2019;38(1):472.

Conti BJ, Santiago KB, Búfalo MC, Herrera YF, Alday E, Velazquez C, et al. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *J Pharm Pharmacol*. outubro de 2015;67(10):1431–8.

Conti BJ, Santiago KB, Cardoso EO, Freire PP, Carvalho RF, Golim MA, et al. Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF-κB activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. *J Pharm Pharmacol*. dezembro de 2016;68(12):1604–12.

Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. dezembro de 2004;15(6):964–70.

Dabas D, Elias RJ, Ziegler GR, Lambert JD. In Vitro Antioxidant and Cancer Inhibitory Activity of a Colored Avocado Seed Extract. *Int J Food Sci*. 2019;2019:6509421.

Daugusch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. dezembro de 2008;5(4):435–41.

de Carvalho FM de A, Schneider JK, de Jesus CVF, de Andrade LN, Amaral RG, David JM, et al. Brazilian Red Propolis: Extracts Production, Physicochemical Characterization, and Cytotoxicity Profile for Antitumor Activity. *Biomolecules*. 6 de maio de 2020;10(5).

de Figueiredo SM, Nogueira-Machado JA, Almeida B de M, Abreu SRL, de Abreu JAS, Filho SAV, et al. Immunomodulatory properties of green propolis. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2014;8(2):85–94.

de Mendonça ICG, Porto ICC de M, do Nascimento TG, de Souza NS, Oliveira JM dos S, Arruda RE dos S, et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 14 de outubro de 2015;15:357.

De-Melo A, Matsuda A, Almeida-Muradian L. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 1º de janeiro de 2012;71:540.

Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. outubro de 2001;1(1):34–45.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 15 de abril de 2019;144(8):1941–53.

Fernandes P, Cabral JMS. Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour Technol*. setembro de 2007;98(12):2335–50.

Figueiredo-Rinhel ASG, Kabeya LM, Bueno PCP, Jorge-Tioossi RF, Azzolini AECS, Bastos JK, et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *J Ethnopharmacol*. 25 de novembro de 2013;150(2):655–64.

Franchin M, Freires IA, Lazarini JG, Nani BD, da Cunha MG, Colón DF, et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem*. 10 de junho de 2018;153:49–55.

Franco S, Bruschi M, Moura LPP, Bueno JHF. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 1º de dezembro de 1999;9–10:1–10.

- Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev.* novembro de 2014;262(1):193–215.
- Fríón-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. *J Pharm Pharmacol.* outubro de 2015;67(10):1448–56.
- Frezza CO da S, Garcia CSC, Gambato G, de Souza MDO, Salvador M, Moura S, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol.* fevereiro de 2013;52:137–42.
- Frezza CO da S, Santos DA, Rufatto LC, Minetto L, Scariot FJ, Echeverrigaray S, et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. *Biomed Pharmacother.* julho de 2017;91:951–63.
- Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, et al. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 5 de dezembro de 2008;377(1):114–9.
- Fulda S, Debatin K-M. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res.* 1º de janeiro de 2004;64(1):337–46.
- Ghasemi S, Lorigooini Z, Wibowo J, Amini-Khoei H. Tricin isolated from *Allium atroviolaceum* potentiated the effect of docetaxel on PC3 cell proliferation: role of miR-21. *Nat Prod Res.* junho de 2019;33(12):1828–31.
- Gibbons NB, Watson RW, Coffey RN, Brady HP, Fitzpatrick JM. Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate.* 15 de setembro de 2000;45(1):58–65.
- Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Sakai T. The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Mol Cancer Ther.* abril de 2006;5(4):945–51.
- Horn LA, Long TM, Atkinson R, Clements V, Ostrand-Rosenberg S. Soluble CD80 Protein Delays Tumor Growth and Promotes Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cancer Immunol Res.* janeiro de 2018;6(1):59–68.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* abril de 1983;43(4):1809–18.
- Hume DA, Irvine KM, Pridans C. The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends Immunol.* fevereiro de 2019;40(2):98–112.
- Isla MI, Dantur Y, Salas A, Danert C, Zampini C, Arias M, et al. Effect of seasonality on chemical composition and antibacterial and anticandida activities of Argentine propolis. Design of a topical formulation. *Nat Prod Commun.* outubro de 2012;7(10):1315–8.
- Jung AY, Cai X, Thoene K, Obi N, Jaskulski S, Behrens S, et al. Antioxidant supplementation and breast cancer prognosis in postmenopausal women undergoing

chemotherapy and radiation therapy. *Am J Clin Nutr.* 1º de janeiro de 2019;109(1):69–78.

Jung Y-H, Heo J, Lee YJ, Kwon TK, Kim Y-H. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. *Life Sci.* 27 de fevereiro de 2010;86(9–10):351–7.

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* julho de 1979;17(1):16–23.

Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *J Agric Food Chem.* 7 de novembro de 2012;60(44):11065–70.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* maio de 2010;11(5):373–84.

Khoo BL, Greci G, Lim JSY, Lim YP, Fong J, Yeap WH, et al. Low-dose anti-inflammatory combinatorial therapy reduced cancer stem cell formation in patient-derived preclinical models for tumour relapse prevention. *Br J Cancer.* fevereiro de 2019;120(4):407–23.

Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, Akao Y, Nozawa Y, et al. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 29 de agosto de 2008;373(3):423–8.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 de outubro de 2009;388(4):621–5.

Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* junho de 1999;38(3):133–42.

Li F, Awale S, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *J Nat Prod.* 23 de abril de 2010;73(4):623–7.

Lopez BG-C. Análise química dos compostos bioativos da própolis vermelha : Chemical analysis of the bioactive compounds of red propolis. Chemical analysis of the bioactive compounds of red propolis [Internet]. 2017 [citado 17 de dezembro de 2020]; Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/332010>

López BG-C, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem.* 1º de março de 2014;146:174–80.

Lotti C, Campo Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Márquez Hernández I, Rastrelli L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric Food Chem.* 24 de fevereiro de 2010;58(4):2209–13.

Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Krawczuk-Rybak M. Lower percentages of monocytes with CD80, CD86 and HLA-DR molecule expression in pediatric cancer. *Cancer Immunol Immunother.* novembro de 2004;53(11):1049–50.

- Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. setembro de 2008;18(3):447–54.
- Maciejewicz W. Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MC and TLC methods. *J LIQ CHROM & REL TECHNOL*. 16 de agosto de 2006;24(8):1171–9.
- Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 15 de maio de 2007;404(1):1–13.
- Moraes CS, Dausch A, Li H, Rhim JS, Park YK. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. *Food Science and Technology*. junho de 2010;30(2):539–43.
- Ogura T, Tanaka Y, Tamaki H, Harada M. Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptotic caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells. *Int J Oncol*. junho de 2016;48(6):2330–8.
- Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Bachiega TF, Búfalo MC, Araújo JP, et al. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res*. agosto de 2010;24(8):1141–6.
- 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(2):205–19.
- Ostlund RE. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:533–49.
- Ozan F, Sümer Z, Polat ZA, Er K, Ozan U, Deger O. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. *Eur J Dent*. outubro de 2007;1(4):195–201.
- Pandey S, Singh S, Anang V, Bhatt AN, Natarajan K, Dwarakanath BS. Pattern Recognition Receptors in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Growth Metastasis*. 2015;8:25–34.
- Park YK, Alencar SM, Scamparini ARP, Aguiar CL. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*. dezembro de 2002;32(6):997–1003.
- Peng F, Meng C-W, Zhou Q-M, Chen J-P, Xiong L. Cytotoxic Evaluation against Breast Cancer Cells of Isoliquiritigenin Analogues from *Spatholobus suberectus* and Their Synthetic Derivatives. *J Nat Prod*. 22 de janeiro de 2016;79(1):248–51.
- Pereira A dos S, Seixas FRMS, Aquino Neto FR de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. maio de 2002;25(2):321–6.
- Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M, Rastrelli L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 22 de junho de 2011;59(12):6484–91.

Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*. novembro de 2002;73 Suppl 1:S7-20.

Pinheiro KS, Ribeiro DR, Alves AVF, Pereira-Filho RN, Oliveira CR de, Lima SO, et al. Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. *Acta Cir Bras*. fevereiro de 2014;29(2):111–7.

Popolo A, Piccinelli LA, Morello S, Cuesta-Rubio O, Sorrentino R, Rastrelli L, et al. Antiproliferative Activity of Brown Cuban Propolis Extract on Human Breast Cancer Cells. *Natural Product Communications*. 1º de dezembro de 2009;4(12):1934578X0900401221.

Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. março de 2005;12(3):221–8.

Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, et al. Retraction: RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*. 11 de setembro de 2020;295(37):13136.

Regueira MS, Tintino SR, da Silva ARP, Costa M do S, Boligon AA, Matias EFF, et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol*. setembro de 2017;107(Pt B):572–80.

Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*. julho de 2003;23(4):519–34.

Righi AA, Negri G, Salatino A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:267878.

Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric*. outubro de 2011;91(13):2363–70.

Saha S, Shilpi J, Mondal H, Hossain F, Anisuzzman M, Hasan M, et al. Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). *Phytopharmacology*. 1º de abril de 2013;4.

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. março de 2005;2(1):33–8.

Salim EI, Abd El-Magid AD, Farara KM, Maria DSM. Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis Against the PC3 Prostate Cancer Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(17):7641–51.

Santiago KB, Conti BJ, Cardoso E de O, Golim M de A, Sforcin JM. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. *Pathog Dis*. novembro de 2016;74(8).

Sena-Lopes Â, Bezerra FSB, das Neves RN, de Pinho RB, Silva MT de O, Savegnago L, et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and

antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PLoS One*. 2018;13(2):e0191797.

Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res*. junho de 2016;30(6):894–905.

Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 27 de janeiro de 2011;133(2):253–60.

Sforcin J, Watanabe M. Effects of Propolis and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Breast Cancer Cells. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 23 de abril de 2018;16.

Shankar S, Chen Q, Siddiqui I, Sarva K, Srivastava RK. Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential. *J Mol Signal*. 24 de agosto de 2007;2:7.

Shen MM, Abate-Shen C. Pten inactivation and the emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*. 15 de julho de 2007;67(14):6535–8.

Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, Sarfaraz S, et al. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene*. 27 de março de 2008;27(14):2055–63.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. janeiro de 2019;69(1):7–34.

Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. setembro de 2008;5(3):313–6.

Siqueira ABS, Gomes BS, Cambuim I, Maia R, Abreu S, Souza-Motta CM, et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Lett Appl Microbiol*. janeiro de 2009;48(1):90–6.

Skjøth IHE, Issinger, OG. Profiling of signaling molecules in four different human prostate carcinoma cell lines before and after induction of apoptosis. *International journal of oncology*, julho de 2006; 28(1):217-229.

Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J Urol*. fevereiro de 2005;173(2):342–59.

Song B, Wang Y, Xi Y, Kudo K, Bruheim S, Botchkina GI, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*. 19 de novembro de 2009;28(46):4065–74.

Spencer BH, McDermott CM, Chess-Williams R, Christie D, Anoopkumar-Dukie S. Prazosin but Not Tamsulosin Sensitises PC-3 and LNCaP Prostate Cancer Cells to Docetaxel. *Pharmacology*. 17 de abril de 2018;102(1–2):10–8.

Šturm L, Ulrich N. Advances in the Propolis Chemical Composition between 2013 and 2018: A Review. *eFood*. 1º de janeiro de 2019;1.

Szliszka E, Czuba ZP, Mazur B, Sedek L, Paradysz A, Krol W. Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 24 de dezembro de 2009;11(1):1–13.

Szliszka E, Czuba ZP, Bronikowska J, Mertas A, Paradysz A, Krol W. Ethanollic Extract of Propolis Augments TRAIL-Induced Apoptotic Death in Prostate Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2011 [citado 17 de dezembro de 2020];2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3138536/>

Szliszka E, Zydowicz G, Janoszka B, Dobosz C, Kowalczyk-Ziomek G, Krol W. Ethanollic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol.* abril de 2011;38(4):941–53.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* janeiro de 2005;17(1):1–14.

Taniguchi H, Yoshida T, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Konishi M, et al. Baicalein overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via two different cell-specific pathways in cancer cells but not in normal cells. *Cancer Res.* 1º de novembro de 2008;68(21):8918–27.

Tomás-Barberán FA, García-Viguera C, Vit-Olivier P, Ferreres F, Tomás-Lorente F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry.* 3 de agosto de 1993;34(1):191–6.

Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:697390.

Tourinho-Barbosa RR, Pompeo ACL, Glina S. Prostate cancer in Brazil and Latin America: epidemiology and screening. *Int Braz J Urol.* dezembro de 2016;42(6):1081–90.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* junho de 2006;3(2):249–54.

Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvetkova I, Gregorio Rodriguez J, Bankova V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia.* dezembro de 2004;75(7–8):683–9.

Turan I, Demir S, Misir S, Kılınç K, Mentese A, Aliyazicioglu Y, et al. Cytotoxic Effect of Turkish Propolis on Liver, Colon, Breast, Cervix and Prostate Cancer Cell Lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 1º de maio de 2015;14:777–82.

Udager AM, Tomlins SA. Molecular Biomarkers in the Clinical Management of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1º de novembro de 2018;8(11).

Ugurel S, Uhlig D, Pföhler C, Tilgen W, Schadendorf D, Reinhold U. Down-regulation of HLA class II and costimulatory CD86/B7-2 on circulating monocytes from melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* junho de 2004;53(6):551–9.

Uvebrant K, Da Graça Thrige D, Rosén A, Åkesson M, Berg H, Walse B, et al. Discovery of Selective Small-Molecule CD80 Inhibitors. *J Biomol Screen*. 1º de junho de 2007;12(4):464–72.

van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*. 3 de fevereiro de 1997;185(3):393–403.

Vatansever H, Sorkun K, Ismet Deliloğlu Gurhan S, Ozdal-Kurt F, Turkoz E, Gencay O, et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem*. novembro de 2010;112(6):546–56.

Wallner S, Schröder C, Leitão E, Berulava T, Haak C, Beißer D, et al. Epigenetic dynamics of monocyte-to-macrophage differentiation. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:33.

Wang T, Chen L, Wu W, Long Y, Wang R. Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Can J Physiol Pharmacol*. maio de 2008;86(5):279–87.

Watanabe MAE, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol*. novembro de 2011;63(11):1378–86.

Xiao P, Ma T, Zhou C, Xu Y, Liu Y, Zhang H. Anticancer effect of docetaxel induces apoptosis of prostate cancer via the cofilin-1 and paxillin signaling pathway. *Mol Med Rep*. maio de 2016;13(5):4079–84.

Yasui Y, Miyamoto S, Kim M, Kohno H, Sugie S, Tanaka T. Aqueous and ethanolic extract fractions from the Brazilian propolis suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Oncol Rep*. setembro de 2008;20(3):493–9.

Zabaiou N, Fouache A, Trousson A, Buñay-Noboa J, Marceau G, Sapin V, et al. Ethanolic extract of Algerian propolis decreases androgen receptor transcriptional activity in cultured LNCaP cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. maio de 2019;189:108–15.

Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol*. 1º de março de 2004;172(5):2778–84.

Apicultura: Manejo e Produtos 3ª Edição – Livraria Funep [Internet]. [citado 17 de dezembro de 2020]. Disponível em:
<https://livraria.funep.org.br/product/apicultura-manejo-e-produtos-3-edic-o/>

Dados Estatísticos do Mercado de Mel_2016_a_2019_11nov2020.pdf [Internet]. [citado 17 de dezembro de 2020]. Disponível em:
https://www.brazilletsbee.com.br/Dados%20Estat%20C3%ADsticos%20do%20Mercado%20de%20Mel_2016_a_2019_11nov2020.pdf

ANEXO 1

UNESP  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
BOTUCATU/SP - CEP: 18618-970 - FONE: (14) 3880-0445

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

CONVIDO o(a) Senhor(a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado "**Ação imunomoduladora da própolis vermelha sobre monócitos humanos e citotóxica sobre células de câncer prostático**", que será desenvolvido por mim, João Carlos Zamae Rodrigues, sob orientação do Professor José Maurício Sforcin, do Instituto de Biociências (UNESP - Botucatu).

Estou estudando os efeitos da própolis vermelha sobre determinadas células do sistema imunológico (monócitos). Para que eu possa obter estas células, preciso coletar 20 mL do seu sangue. Sua participação nesta pesquisa se dará por ser uma pessoa saudável, sem nenhum tipo de doença. O(a) senhor(a) não será tratado(a) com a própolis, apenas as suas células. O único risco para o(a) senhor(a) será em relação à picada da agulha para a coleta de sangue, que poderá ser dolorida e no local poderá aparecer uma mancha roxa e ficar sensível.

O material biológico que coletaremos do(a) senhor(a) será utilizado em sua totalidade, não restando material para ser utilizado em outro projeto de pesquisa. O(a) senhor(a) não terá benefício direto em participar desta pesquisa, porém com sua doação permitirá a realização desta pesquisa, a qual poderá beneficiar futuros pacientes com baixa imunidade.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que, mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elaborado em 2 vias de igual teor: 01 via será entregue ao(à) Senhor(a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11h30 e das 14h00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem que minha identidade seja revelada.

Nome e assinatura do sujeito de pesquisa: _____

Local e data: _____

Karina Basso Santiago
Pós-doutoranda
Depto. Microbiologia e Imunologia
IB – UNESP – Campus de Botucatu

Prof. Associado José Maurício Sforcin
Supervisor da pós-doutoranda
Depto. Microbiologia e Imunologia
IB – UNESP – Campus de Botucatu