

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/07/2016.



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

Ariane Rocha Bartolomeu

**Associação da geoprópolis à quimioterápicos: ação
citotóxica e antiproliferativa sobre células HEP-2 e
mecanismos envolvidos**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Mestre(a) em Patologia.

Orientador: Prof. Adj. José Maurício Sforcin

**Botucatu
(2016)**

Ariane Rocha Bartolomeu

Associação da geoprópolis à quimioterápicos:
ação citotóxica e antiproliferativa sobre células
HEp-2 e mecanismos envolvidos

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre(a)
em Patologia.

Orientador: Prof. Adj. José Maurício Sforcin

Botucatu
(2016)

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

Bartolomeu, Ariane Rocha.

Associação da geoprópolis à quimioterápicos : ação citotóxica e antiproliferativa sobre células HEP-2 e mecanismos envolvidos / Ariane Rocha Bartolomeu. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Maurício Sforcin

Capes: 21007004

1. Geoprópolis. 2. Apoptose. 3. Preparações farmacêuticas. 4. Citotoxicidade. 5. Patologia.

Palavras-chave: Apoptose; Células HEP-2; Geoprópolis; Glicoproteína-P; Quimioterápicos.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Sônia (*in memorian*), que nunca deixou de me amar,
nem de confiar em mim. Mãe, meu amor eterno.

Ao meu esposo Waltherson, um agradecimento especial pelo apoio e
carinho diários, pela transmissão de confiança e de força, em todos os
momentos. Por tudo, a minha enorme gratidão!

Aos meus sogros, Regina e Walter, que sempre me acolheram como
filha, obrigada pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Adj. José Maurício Sforcin, meus sinceros agradecimentos
pela orientação deste trabalho.

À Profa. Adj. Maria de Lourdes Ribeiro da Souza Cunha, obrigada por
me dar a primeira oportunidade de ter o contato com a ciência

Ao Prof. Dr. Rafael Nobrega e sua aluna Dr. Melanie do
Departamento de Morfologia pela prestatividade e ajuda

Aos técnicos, amigos e funcionários do Departamento de
Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências pelo convívio,
auxílio e apoio em momentos cruciais.

A todos os professores do curso que tanto contribuíram para meu
aprendizado e para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Lívia e Yahima pelo companheirismo e pelos ricos
debates que realizamos ao longo do trajeto.

Aos meus amigos e companheiros de viagem que estiveram ao meu
lado durante esta fase, pelo companheirismo, força e apoio.

Ao programa de Pós-graduação em Patologia, meus sinceros
agradecimentos pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES), pelo auxílio
financeiro.

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

“A ignorância mais frequentemente gera confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam categoricamente que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência”
(Charles Darwin)

Resumo

O tratamento concomitante entre dois ou mais fármacos é uma prática comum na terapia antineoplásica. A carboplatina (CARB), metotrexato (MXT) e doxorrubicina (DOX) são os agentes convencionais mais utilizados na terapia antitumoral. Geoprópolis (Geo) é produzida por algumas abelhas sem ferrão a partir de uma mistura que contém resinas, fibras vegetais, secreção glandular das abelhas e terra ou barro. Para determinar a ação antiproliferativa e citotóxica da Geo isolada ou associada à CARB, MXT e DOX, células de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2) foram tratadas por 24, 48 e 72 horas com Geo na presença ou ausência desses fármacos. A viabilidade celular, citotoxicidade e apoptose foram obtidos pelo ensaio de 3-(4,5-dimethyl thiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), quantificação da liberação da lactato desidrogenase (LDH), citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente. A influência de Geo sobre a resistência à quimioterápicos foi obtida através da análise da ação da glicoproteína-P (P-gp). A combinação entre Geo e DOX demonstrou efeito inibitório significativo sobre as células HEp-2 mediado por indução de apoptose. Geo não afetou a ação da P-gp, sugerindo que esse produto natural não interfere no efluxo da DOX mediado pela P-gp. Os resultados obtidos indicam o potencial inibitório da associação entre Geo + DOX, e os mecanismos pelos quais esses fenômenos ocorrem merecem futuras investigações, visando novas perspectivas terapêuticas na terapia antineoplásica.

Palavras chaves: geoprópolis, agentes quimioterápicos, apoptose, glicoproteína-P

Abstract

Drug combination therapies are a common practice in cancer treatment. Carboplatin (CARB), methotrexate (MXT) and doxorubicin (DOX) are the most used chemotherapeutic agents for cancer treatment. Geopropolis (Geo) is produced by some stingless bees from a mixture of vegetable resins, gland secretions of the bees and soil. To determine whether Geo enhances the anticancer effect of CARB, MXT and DOX, human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells were treated for 24, 48 and 72 h with Geo alone or in combination with each drug. Cell growth, cytotoxicity and apoptosis was evaluated using 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, lactate dehydrogenase (LDH) release, flow cytometry and transmission electron microscopy. The influence of Geo on drug resistance was also investigated assessing P-glycoprotein (P-gp) action. Data showed that the combination Geo + DOX led to a higher cytotoxic activity inhibiting the growth of HEp-2 cells and inducing apoptosis. Geo did not affect the action of P-gp, suggesting that this natural product does not interfere with the P-gp-mediated efflux of DOX. Our findings indicate that Geo combined with DOX could be a potential clinical chemotherapeutic approach for laryngeal cancer treatment.

Keywords

Geopropolis, chemotherapeutic agents, apoptosis, P-glycoprotein

Sumário

Revisão de literatura.....	11
1. Câncer: características gerais.....	11
1.1. Câncer de laringe.....	11
2. Mecanismo de ação e efeitos colaterais dos tratamentos quimioterápicos	13
3. Resistência à antineoplásicos.....	16
4. Indução de apoptose	17
5. Associação de produtos naturais à fármacos antineoplásicos	20
6. Geoprópolis: características gerais	21
7. Referências bibliográficas.....	24
Capítulo I – Manuscrito: Combinatory effects of geopropolis with conventional anticancer drugs towards human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells	31
Abstract	32
Introduction	33
Materials and methods.....	34
Chemical and Reagents	35
Cells cultures.....	35
Geoprópolis sample.....	35
Chemotherapeutic agents combined with Geo	35
Viability assay.....	36
Cytotoxicity assay.....	36
<i>In vitro</i> migration assay.....	36
Apoptosis analysis by flow cytometry	37
Morphological analysis	37
Effect of a P-glycoprotein inhibitor (verapamil) on HEp-2 cells.....	38
Statistical analysis	38
Results	38
Effects of Geo extract on the growth of HEp-2 cells.....	38
LDH release assay	40

<i>In vitro</i> migration assay.....	41
Combined effect of Geo with DOX, MXT and CARB on HEP-2 cells viability	43
Apoptotic effect of Geo and DOX on HEP-2 cells.....	46
Morphological changes.....	47
Effects of VRP on sensitivity of HEP-2 cells to Geo + DOX.....	47
Discussion	48
Conclusions	52
References	53

Revisão de Literatura

1. Câncer: características gerais

Câncer é um termo genérico relacionado a um grupo de doenças que podem afetar diversas partes do corpo. Outros termos designados para esse grupo de doenças são tumores e neoplasias. A característica principal do desenvolvimento de um câncer é o crescimento desordenado e anormal de células com capacidade de invadir tecidos adjacentes, se espalhando para outros órgãos, processo este denominado de metástase. As condições para o desenvolvimento tumoral são multifatoriais e podem agir em conjunto ou sequencialmente para promover sua iniciação (1-3).

O câncer é uma das principais causas de morte tanto em países mais desenvolvidos economicamente ou em desenvolvimento. Além disso, a incidência cresce conforme a longevidade e a adoção de hábitos conhecidos como fatores de risco (4, 5). Apesar de tantos anos dedicados a estudos para a sua compreensão, o câncer ainda continua sendo uma doença que carece de maiores investigações e terapias eficazes (6).

1.1. Câncer de laringe

O câncer de laringe é o tipo de neoplasia mais comum dentre os cânceres de cabeça e pescoço (7). A grande maioria destas neoplasias apresenta, como tipo histológico, o carcinoma de células escamosas, sendo raramente do tipo adenocarcinoma (8).

O câncer de laringe é causado principalmente pelo tabagismo e consumo de álcool. Esta malignidade pode atingir diferentes partes anatômicas da laringe dependendo da sua etiologia. O tabaco influencia o desenvolvimento do tumor na região das cordas vocais, enquanto o álcool é o fator de risco mais agravante no desenvolvimento do câncer de supraglote (9, 10). Porém, dados atuais revelam que tumores de cabeça e pescoço, incluindo câncer de laringe, estão acometendo jovens de 30 a 45

anos que não possuem hábitos tabagistas e não fazem consumo de álcool. Médicos e pesquisadores concluíram que o papiloma vírus humano (HPV), microrganismo que pode acometer pessoas de qualquer idade, pode causar infecções que levam subsequentemente ao desenvolvimento desses tumores (11, 12).

O câncer de laringe está entre os mais incidentes mundialmente. Na Europa, 52.000 novos casos são identificados anualmente; nos Estados Unidos da América, a incidência foi de 12 mil novos casos no ano de 2014 (13, 14). No Brasil, o quadro de incidência do câncer de laringe também é alarmante, e estima-se que 6.870 novos casos são observados em homens e 770 em mulheres, estando entre os dez cânceres que mais acometem os homens (15). A taxa de incidência crescente não é exclusividade do sexo masculino, e sua incidência vem crescendo também entre as mulheres por causa dos hábitos tabagistas e aumento no consumo de álcool entre elas (16, 17).

Os sintomas que surgem a partir das lesões levam as pessoas recorrerem aos serviços de saúde. A rouquidão indica o início de lesão na parte da glote que pode tardiamente atingir a parte supraglótica causando disfagia, sensação de corpo estranho e tosse. O diagnóstico pode ser feito através de laringoscopia, imagenologia e exames histológicos (18, 19).

O tratamento para esse tipo de neoplasia é complexo e, em muitos casos, requer conhecimentos multidisciplinares. O tipo de terapêutica vai depender do grau de malignidade do tumor e do estágio em que se encontra. Muitas vezes, a melhor solução é ressecção cirúrgica, embora este método possa ser devastador, pois implica em transformações em uma área muito visível da face. Além disso, a fala e a deglutição podem ser comprometidas (19-21). Além da ressecção, a quimioterapia e a radioterapia são preconizadas para tratamento desse tipo de tumor, porém problemáticas como resistência e alta toxicidade estão implicadas no sucesso dessas duas terapêuticas (22, 23).

Linhagens celulares imortalizadas têm sido uma ferramenta valiosa na investigação molecular, bioquímica, genética e imunológica de células derivadas de câncer de cabeça e pescoço. Diversas células têm sido utilizadas nestes estudos, e as primeiras a serem estudadas foram as células HEP-2, HEP-3 e KB. Muitas outras células foram investigadas posteriormente, tais como as células FaDu, HN-1, UM-SCC-22B, UM-SCC-30, CAL27, MDA-1483, MDA-886LN, MDA-686LN, T1/CUHK, T2/CUHK, entre outras (24-28). Em nosso estudo, utilizamos as células da linhagem HEP-2, as quais foram descritas inicialmente como sendo derivadas de carcinoma epidermóide da laringe, mas subsequentemente foram encontrados marcadores cromossômicos de células HeLa, com base em análise de isoenzimas, provavelmente por contaminação com estas células.

2. Mecanismos de ação e efeitos colaterais dos tratamentos quimioterápicos

Os agentes antitumorais podem agir de várias maneiras, inibindo o processo carcinogênico e a proliferação celular (29). Esses agentes podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo e estrutura química.

Os agentes alquilantes causam danos diretamente no DNA, pois seu grupo alquil se liga covalentemente ao DNA ou a proteínas, interferindo em sua ação e impedindo a replicação celular. Esses fármacos agem em todas as fases do ciclo celular e são utilizados para o tratamento de muitos cânceres diferentes, incluindo leucemia, linfoma, doença de Hodgkin, entre outros. Dentre os agentes alquilantes, temos a cisplatina, carboplatina (CARB) e lomustine (30). CARB tem um amplo espectro de ação, podendo atuar contra vários tipos de cânceres, incluindo tumores de cabeça e pescoço (31). Este fármaco é um análogo da cisplatina de segunda geração e apresenta baixa toxicidade. Por este motivo, tem sido escolhido para tratamento de pacientes que sofrem com a toxicidade da cisplatina (23, 31). A CARB se intercala no ácido desoxirribonucléico (DNA), formando ligações

cruzadas e interferindo em sua função (32).

Os fármacos antimetabólitos são definidos como fármacos que interferem em processos metabólicos normais no interior da célula. Um dos antimetabólitos mais conhecidos é o metotrexato (MXT). O conhecimento dos mecanismos intracelulares tem aumentado nos últimos anos, permitindo a identificação de novos alvos potenciais. Tais antimetabólitos interferem em vias importantes que levam à síntese de purinas e pirimidinas: os co-fatores derivados de folato e os que inibem a dihidrofolato redutase, timidilato sintase e glicinamida ribonucleotídeo formiltransferase (33). O metotrexato é um inibidor da dihidrofolato redutase (34, 35), inibindo o metabolismo do ácido fólico (35). É um composto antiproliferativo e imunossupressor, utilizado contra vários tipos de doenças, incluindo tratamento do câncer de laringe (36). O MXT acarreta efeitos colaterais que compreendem desde náuseas e vômitos até cirrose, hepatite e anemia (37).

Antibióticos antitumorais também são amplamente utilizados no tratamento antineoplásico. Como exemplo, as antraciclinas interferem na ação de enzimas envolvidas na replicação do DNA. Esses fármacos agem em todas as fases do ciclo celular. A doxorubicina (DOX) e a daunorrubicina (DNR) foram isoladas a partir do pigmento produzido por *Streptomyces peucetius* (38). DOX é um dos antineoplásicos prescritos mais potentes, exibindo um amplo espectro de ação tanto contra tumores hematopoiéticos quanto em relação aos tumores sólidos. Estudos têm atribuído a ação antitumoral da DOX à sua capacidade de se intercalar no DNA ou se ligar covalentemente às proteínas envolvidas na replicação e transcrição (39). Assim, essa interação resulta em inibição do DNA, RNA e síntese de proteínas, causando morte celular (40). Apesar de a DOX ter ação contra vários tipos de neoplasias, sua toxicidade limita o sucesso do tratamento (41, 42).

Os inibidores das topoisomerasas interferem na ação dessas enzimas, as quais desempenham um importante papel na replicação do DNA (43). A

camptotecina é um antineoplásico que foi isolado pela primeira vez da casca de uma árvore chinesa, a *Camptotheca acuminata* (22). As camptotecinas possuem características farmacológicas distintas, inibindo principalmente a ação da topoisomerase I, tornando-a citotóxica. Os inibidores da topoisomerase I atuam danificando a replicação do DNA na fase S do ciclo celular (44).

Os inibidores de mitose muitas vezes são alcalóides derivados de plantas e outros compostos oriundos de produtos naturais. Agem principalmente induzindo parada da mitose na fase M do ciclo celular, mas também podem agir em outras fases inibindo a proliferação celular. Nessa classe, temos os inibidores de microtúbulos e de cinases (45). Os taxanos e os alcalóides da vinca são os dois grupos mais antigos de inibidores de segmentação dos microtúbulos. Ambos compostos impedem a conclusão do ciclo celular pela sua junção às subunidades beta das tubulinas, resultando na formação de microtúbulos estáveis e não funcionais, aprisionando as células na fase G2 / M (45, 46).

Além dos fármacos supra-citados, outros também podem ser associados à quimioterapia antineoplásica, tais como corticoesteróides, L-asparaginase e o inibidor de proteassoma bortezomib (Velcade®) (47).

Historicamente, os tratamentos antineoplásicos são conhecidos por sua ampla lista de efeitos colaterais causados pela toxicidade e indução de resistência em células tumorais (48-50). Ademais, um dos grandes fatores implicados na toxicidade dos agentes antitumorais é a falta de seletividade entre as células normais e tumorais. Além dos efeitos colaterais clássicos como náuseas, vômitos e alopecia, estes agentes estão associados a outros efeitos mais graves, tais como cardiotoxicidade; esteatose hepática; pseudocirrose; pancreatite; esclerose biliar, dentre outros (42, 51, 52).

Em nosso trabalho, optamos por utilizar a carboplatina, o metotrexato e a doxorrubicina, por apresentarem diferentes mecanismos de ação, além de serem utilizados também no tratamento de câncer de laringe.

3. Resistência à antineoplásicos

O termo “resistência a drogas” em relação aos tratamentos de tumores é utilizado sinonimamente com “progressão da doença”. Uma vez que o paciente desenvolve resistência adquirida a um determinado fármaco, outra estratégia terapêutica deve ser adotada (49). A resistência de células tumorais é um fenômeno complexo que envolve múltiplas proteínas, porém as mais estudadas estão relacionadas a um único fenótipo, o *Multidrug Resistance* (MDR) (53). Este fenótipo MDR foi descoberto na década de 70, estando relacionado à expressão elevada de uma proteína denominada glicoproteína-P (P-gp) (54). Além da P-gp, também estão envolvidas com o MDR a proteína associada ao MDR 1 (também conhecida como MRP1 ou ABCC1) e BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*). Tais proteínas têm como principal função promover a eliminação de vários compostos hidrofóbicos, incluindo a maioria dos quimioterápicos, assim como taxanos, inibidores da topoisomerase e antimetabólitos (55).

A P-gp foi o primeiro transportador a ser identificado. Esta glicoproteína é expressa na membrana celular de quase todos os tecidos em níveis basais, mas em tecidos com papel excretor o seu nível de expressão é maior (56, 57). Em tumores, geralmente a expressão da P-gp pode aumentar através da sensibilização induzida por quimioterápicos, causando assim, resistência intrínseca a essas drogas e resultando no insucesso da terapia e progressão da doença (58-60).

A administração concomitante de dois ou mais agentes antineoplásicos tem sido uma estratégia adotada para se obter uma melhor resposta no tratamento de tumores em estágio mais avançado (61). Apesar de a adoção de tratamentos concomitantes muitas vezes prolongar a sobrevida do paciente, não há garantias de redução dos efeitos colaterais e de não resistência por parte das células tumorais (49, 62, 63).

Estudos têm relatado a eficácia da quimioterapia combinada com inibidores da P-gp na reversão do quadro de resistência (64, 65). Verapamil

(VRP) é um bloqueador de canais de cálcio comumente utilizado no tratamento de hipertensão, angina e infarto do miocárdio (66) e tem sido mencionado como agente capaz de reverter a resistência causada pela P-gp (67), sendo, portanto, combinado com drogas anticancerígenas (68, 69).

Além dos inibidores de P-gp, dados demonstram que produtos naturais também podem agir como adjuvante de forma sinérgica com agentes antitumorais causando aumento na sensibilidade de células tumorais (70).

4. Indução de apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular programada e ocorre com frequência em organismos multicelulares, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. Em condições fisiológicas, a apoptose tem um papel fundamental no controle do crescimento, proliferação celular e na resposta imune, mantendo os tecidos em homeostase (71, 72).

A apoptose pode ser ativada tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca. A via extrínseca é ativada por ligantes específicos, como o FasL, a um grupo de receptores de membrana da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (rTNF) (73). Esta ligação é capaz de desencadear a cascata das caspases (Figura 1). Todos os membros desta superfamília possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, que permite o reconhecimento de seus ligantes resultando em trimerização e consequente ativação de receptores específicos de morte. Após esse evento, ocorre uma sinalização citoplasmática envolvendo a porção inferior desses receptores conhecida como domínio de morte que interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas recrutam a caspase-8 que ativará a caspase-3, iniciando a morte por apoptose (74, 75).

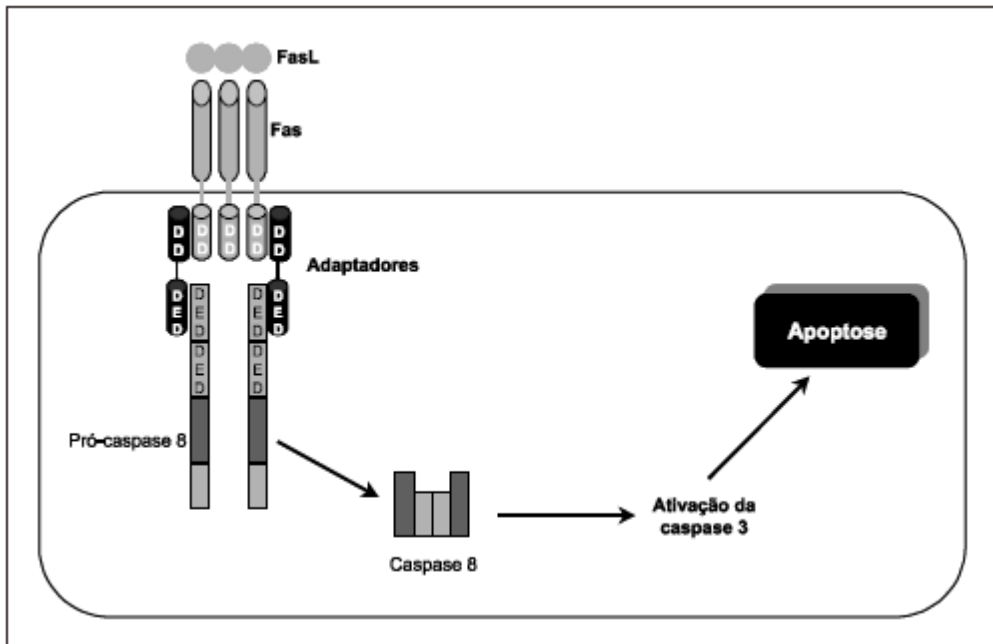


Figura 1. Via extrínseca de ativação de apoptose. DD = domínio de morte; DED = domínio efetor de morte (Fonte: Grivicich *et al.*, 2007).

A via intrínseca pode ser ativada por estresse intracelular ou extracelular. Os sinais transduzidos em resposta à esses estímulos convergem principalmente para a mitocôndria, como sendo o principal mediador desse tipo de morte (77). Essa organela capta os estímulos de morte celular e induz a permeabilidade mitocondrial com consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas (78). Quando os sinais de morte alcançam a mitocôndria, o colapso do potencial de membrana mitocondrial interna é desencadeado ($\Delta\psi$) junto com a transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) (79, 80). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\psi$ e TPM acarretam a perda da homeostasia celular, interferindo na síntese de ATP e levando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (81). Níveis elevados de EROS desencadeiam a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, elevando o colapso $\Delta\psi$ (82). Além disso, sabe-se que as EROS ativam as caspases -9 e -3 (83, 84). Outro mecanismo relacionado é a formação de um megaporo

constituído de diversas proteínas e que abrange as membranas internas e externas da mitocôndria (85). Por este poro, ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma. Diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, acarretando o desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação de citocromo *c* e de proteínas ativadoras de apoptose para o citosol (80). Quando no citosol o citocromo *c* forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o apoptossomo promove clivagem da pró-caspase-9, tornando a caspase-9 ativa (73). Uma vez ativada, a caspase-9 induz ativação da caspase-3, ocasionando a apoptose (Figura 2) (86, 87).

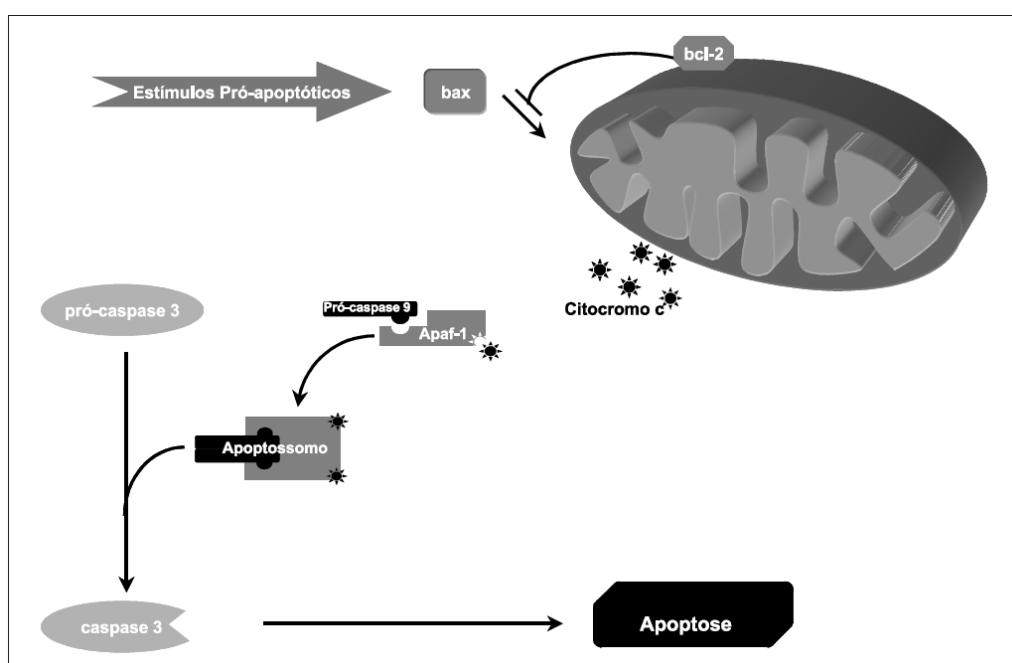


Figura 2. Via intrínseca de ativação da apoptose. APAF-1 = Fator de ativação de protease associada à apoptose 1. (Fonte: Grivicich *et al.*, 2007).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada por condensação da cromatina, condensação do núcleo e do citoplasma, seguida de fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos, que serão posteriormente engolfados por células fagocíticas e digeridos pela ação de enzimas lisossomais (72). Esse processo é regulado por genes pró-apoptóticos (p53, Bax e c-Myc) ou anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, sentrin)

(88).

A apoptose tem a importante função de proteger os organismos contra a tumorigênese, sendo, portanto, a desregulação da apoptose uma característica fundamental no desenvolvimento tumoral (89). A regulação da indução da apoptose tem sido descrita como uma das melhores estratégias na terapia antineoplásica (90), e comprometimento no mecanismo de sinalização apoptótica pode possibilitar a proliferação de células tumorais (91).

Há vários quimioterápicos antineoplásicos convencionais que atuam na indução da apoptose (92-94). Além dos quimioterápicos, há também relatos que indicam produtos naturais como indutores de apoptose. Um estudo demonstrou que um polissacarídeo isolado do cogumelo medicinal *Fomes fomentarius* possui propriedades apoptóticas contra células de carcinoma de pulmão (95). Vatansever *et al.*, (2010) demonstrou o potencial da própolis oriunda da Turquia ao induzir apoptose por ativação da via das caspases em células de carcinoma mamário.

5. Associação de produtos naturais à fármacos antineoplásicos

Produtos naturais têm sido um excelente recurso em nossa sociedade. O uso de plantas medicinais e metabólitos microbianos tem ampliado a expectativa de vida, seja empiricamente ou a partir da síntese de medicamentos de origem natural (96). A ação antineoplásica de produtos naturais tem sido intensamente investigada e $\frac{3}{4}$ dos compostos antitumorais são sintetizados a partir de produtos naturais ou relacionado à eles. Dos 140 agentes antitumorais e disponíveis desde a década de 40, mais de 60% são oriundos de compostos naturais (97). Esses agentes agem através de mecanismos que incluem indução de apoptose, clivagem do DNA mediada pela inibição pela topoisomerase I ou II, permeabilização mitocondrial, inibição de enzimas envolvidas na transdução de sinal ou no metabolismo celular, e por inibição da angiogênese (96).

Com o intuito de atenuar os efeitos colaterais causados pelos agentes antitumorais, o estudo da administração de produtos naturais concomitantemente com fármacos tem sido investigado, a fim de obter uma interação entre ambos por efeito aditivo, sinérgico, antagônico ou potencializador (98, 99). Janssen *et al.* (2014) demonstraram que o resveratrol combinado com curcumina potencializou o efeito inibitório da DOX sobre células de câncer de ovário, atenuando seus efeitos cardiotóxicos sobre cardiomiócitos. A curcumina acarretou melhora no efeito supressor da cisplatina sobre células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço, por inibir a via do NF- κ B e da proteína IKK β (100).

Além de plantas medicinais e metabólitos microbianos, há também os opoterápicos obtidos a partir de glândulas, órgãos, tecidos ou secreções animais (101). Um exemplo de opoterápico é a própolis produzida por abelhas africanizadas. A própolis e seus componentes vêm sendo apontados como agente citotóxico, antitumoral e quimiopreventivo contra vários tipos de tumores (102-104). Estudos indicam seu potencial em melhorar sinergisticamente a ação de drogas antitumorais (105, 106).

6. Geoprópolis: características gerais

Diferentemente da própolis produzida por abelhas africanizadas, a geoprópolis é produzida por abelhas sem ferrão (meliponíneos) a partir da mistura de resina, fibras vegetais, cera e, tipicamente, incluindo terra ou barro. Nestas colônias, a geoprópolis é utilizada amplamente, servindo como base para construção de estruturas externas (tubos e entrada) e internas (favos de cria, lamelas de invólucro e potes de alimento) (107).

De modo geral, as amostras de geoprópolis apresentam-se como fragmentos rígidos e com diferentes tamanhos, com grânulos inodoros e de consistência heterogênea, coloração marrom escura e sabor amargo (Figura 3). Assim como para a própolis produzida por abelhas africanizadas, o método de preparo dos extratos de geoprópolis pode influenciar em sua

atividade, uma vez que os diferentes solventes solubilizam e extraem compostos diferentes (108).

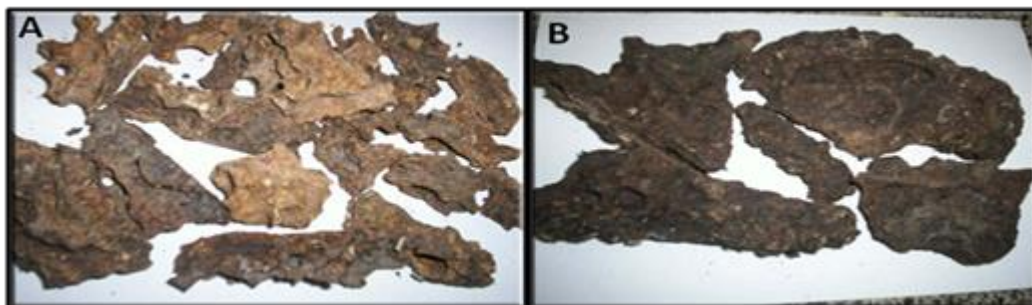


Figura 3. Própolis produzida por *Scaptotrigona* aff. *postica* (A) e geopropolis produzida por *Melipona fasciculata* Smith (B). Foto: Abigail Araújo.

As ações farmacológicas da geopropolis têm sido investigadas mais recentemente, tais como antimicrobiana, imunomoduladora e citotóxica, porém essas propriedades não estão bem esclarecidas por falta referências e estudos sobre esse produto (109). Geopropolis tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de doenças respiratórias e dermatoses (110). Também foi verificada sua ação como agente citotóxico contra células de osteossarcoma canino (111). No entanto, estudos demonstraram também seu efeito antiproliferativo sobre outras linhagens tumoral humana (112).

A amostra utilizada em nosso estudo foi analisada quimicamente, revelando que seus principais compostos são lupeol, amirinas, ácido anacárdico dentre outros (109, 113-117). Nossa amostra de geopropolis foi trazida do Estado do Maranhão por uma doutoranda de nosso grupo, a qual observou sua ação antimicrobiana, imunomoduladora e citotóxica contra células HEP-2. Os dados incitaram-nos a dar continuidade a estas investigações e, neste projeto, avaliamos a ação da geopropolis associada a diferentes quimioterápicos contra estas células, avaliando o efeito antiproliferativo e citotóxico, indução de apoptose e morfologia celular, e inibição sobre a P-gp.

Os dados obtidos junto a esta dissertação encontram-se apresentados

a seguir junto ao manuscrito intitulado **“Combinatory effects of geopropolis with conventional anticancer drugs towards human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells”**, que será submetido a publicação após a defesa de mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):607-15.
2. World Health Organization. Global action plan for the prevention and control of NCDs 2013-2020. Geneva: WHO; 2014.
3. World Health Organization Internet. International Agency for Research on Cancer. Stewart BW, Wild CP, editors [Internet]. World Cancer Report 2014. Lyon (FRA): IARC; 2014 [cited 2015 May 9]. Available from: <http://whocp3.codemantra.com/Marketing.aspx?ID=WCR2014&ISBN=9789283204299&sts=b>.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. PubMed PMID: 25651787.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(1):11-30. PubMed PMID: 23335087.
6. Sonnenschein C, Soto AM, Rangarajan A, Kulkarni P. Competing views on cancer. *J Biosci.* 2014;39(2):281-302. PubMed PMID: 24736160.
7. Marioni G, Marchese-Ragona R, Carlei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2006;32(7):504-15.
8. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. *Eur J Cancer.* 2005;41(5):683-93. PubMed PMID: 15763643.
9. Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer.* 1988;41(4):483-91. PubMed PMID: 3356483.
10. Glade MJ. Food, nutrition and prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition.* 1999;15(6):523-6. PubMed PMID:10378216.
11. Duray A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Rummelink M, Sirtaine N, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol.* 2011;39(1):51-9. PubMed PMID: 21573490.
12. Betiol J, Villa L, Sichero L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46(3):217-26. PubMed PMID: 23532264.
13. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon (FRA): IARCPress; 2001.
14. American Cancer Society. Cancer facts & figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; 2014.
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva; 2014.
16. Cox SR, Theurer JA, Spaulding SJ, Doyle PC. The multidimensional impact of total laryngectomy on women. *J Commun Disord.* 2015;56:59-75. PubMed PMID: 26186255.
17. Freedman ND, Abnet CC, Caporaso NE, Fraumeni Jr. JF, Murphy G, Hartge P, et al. Impact of changing US cigarette smoking patterns on incident cancer: risks of 20 smoking-related cancers among the women and men of the NIH-AARP cohort. *Int J Epidemiol.* 2015. PubMed PMID: 26411408.
18. Barbera L, Groome PA, Mackillop WJ, Schulze K, O'Sullivan B, Irish JC, et al. The role of computed tomography in the T classification of laryngeal carcinoma. *Cancer.* 2001;91(2):394-407.

19. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, et al. Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;47(1):65-80.
20. Robbins KT, Atkinson JLD, Byers RM, Cohen JI, Lavertu P, Pellitteri P. The use and misuse of neck dissection for head and neck cancer. *J Am Coll Surg*. 2001;193(1):91-102.
21. Andrade RO. As Novas faces do Câncer. *Rev Pesqui FAPESP*. 2015;233:41-45.
22. Fernberg JO, Ringborg U, Silfversward C, Ewert G, Haglund S, Schiratzki H, et al. Radiation therapy in early glottic cancer. Analysis of 177 consecutive cases. *Acta Otolaryngol*. 1989;108(5-6):478-81. PubMed PMID: 2589076.
23. Hamauchi S, Yokota T, Onozawa Y, Ogawa H, Onoe T, Kamijo T, et al. Safety and efficacy of concurrent carboplatin plus radiotherapy for locally advanced head and neck cancer patients ineligible for treatment with cisplatin. *Jpn J Clin Oncol*. 2015:1-6. PubMed PMID: 26423341.
24. Jetten AM, Kim JS, Sacks PG, Rearick JI, Lotan D, Hong WK, et al. Inhibition of growth and squamous-cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma cells by beta-all-trans retinoic acid. *Int J Cancer*. 1990;45(1):195-202. PubMed PMID: 1967595.
25. Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout J, Kal HB, Theeuwes AG. Effectiveness of cis-platin and carboplatin in the chemotherapy of squamous cell carcinoma grown as multicellular spheroids. *Anticancer Res*. 1990;10(3):805-11. PubMed PMID: 2195988.
26. Schwachofer JH, Crooijmans RP, Van Gasteren J, Hoogenhout J, Jerusalem CR, Kal HB. Sublethal damage repair and radiosensitivity of human squamous cell carcinoma cells grown with different culture techniques. *Br J Radiol*. 1989;62(744):1084-8. PubMed PMID: 2605456.
27. Sturgis EM, Sacks PG, Masui H, Mendelsohn J, Schantz SP. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994;111(5):633-43. PubMed PMID: 7970803.
28. Griffon-Etienne G, Merlin JL, Marchal C. In vitro evaluation of Taxol combined with radiations in human squamous cell carcinoma spheroids. *Cancer Lett*. 1996;109(1-2):23-32. PubMed PMID: 9020899.
29. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*. 2009;59(6):365-78. PubMed PMID: 19429468.
30. Siddik ZH. Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: Dna-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. In: Alison MR, editor. *The cancer handbook*. Houston: John Wiley & Sons; 2005.
31. Lokich J, Anderson N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol*. 1998;9(1):13-21. PubMed PMID: 9541678.
32. Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev*. 2003;23(5):633-55. PubMed PMID: 12789689.
33. Kaye SB. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *Br J Cancer*. 1998;78 Suppl 3:1-7. PubMed PMID: PMC2062805.
34. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med*. 1983;309(18):1094-104. PubMed PMID: 6353235.
35. Wood GS, Wu J. Methotrexate and pralatrexate. *Dermatol Clin*. 2015;33(4):747-55.
36. Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2285-95.

37. Rodrigues M, Westerman D, Lade S, McCormack C, Prince HM. Methotrexate-induced lymphoproliferative disorder in a patient with Sezary syndrome. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(10):2257-9.
38. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185-229. PubMed PMID: 15169927.
39. Box VGS. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomyacin. *J Mol Graph Model*. 2007;26(1):14-9.
40. Cutts SM, Parsons PG, Sturm RA, Phillips DR. Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *J Biol Chem*. 1996;271(10):5422-9. PubMed PMID: 8621397.
41. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267-85. PubMed PMID: 19548866.
42. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(6):1213-25. PubMed PMID: 22465037.
43. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Ann Rev Biochem*. 2001;70:369-413. PubMed PMID: 11395412.
44. Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist Updat*. 1999;2(5):307-18.
45. Jiang N, Wang X, Yang Y, Dai W. Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2006;6(8):885-95. PubMed PMID: 16918495.
46. Yardley DA. Gemcitabine plus paclitaxel in breast cancer. *Semin Oncol*. 2005;32(4 Suppl 6):S14-21. PubMed PMID: 16143163.
47. American Cancer Society. Types of chemotherapy drugs. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
48. Albin A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(1):14-25. PubMed PMID: 20007921.
49. Kuczyński EA, Sargent DJ, Grothey A, Kerbel RS. Drug rechallenge and treatment beyond progression - implications for drug resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(10):571-87. PubMed PMID: 23999218.
50. Shankar A, Roy S, Malik A, Julka P, Rath G. Prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(15):6207-13. PubMed PMID: 26434818.
51. Ngo D, Jia JB, Green CS, Gulati AT, Lall C. Cancer therapy related complications in the liver, pancreas, and biliary system: an imaging perspective. *Insights Imaging*. 2015;1-13. PubMed PMID: 26443452.
52. Brown SA, Sandhu N, Herrmann J. Systems biology approaches to adverse drug effects: the example of cardio-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;1-14.
53. Holohan C, Schaeuble SV, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:714-26.
54. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152-62. PubMed PMID: 990323.
55. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):48-58. PubMed PMID: 11902585.
56. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361-98. PubMed PMID: 10331089.

57. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* 2005;5(30):1-13.
58. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control.* 2003;10(2):159-65. PubMed PMID: 12712010.
59. Triller N, Korosec P, Kern I, Kosnik M, Debeljak A. Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer.* 2006;54(2):235-40. PubMed PMID: 16934363.
60. Nooter K, Brutel de la Riviere G, Look MP, van Wingerden KE, Henzen-Logmans SC, Scheper RJ, et al. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(4):486-93. PubMed PMID: 9275026.
61. Shinomiya H, Hasegawa S, Yamashita D, Ejima Y, Kenji Y, Otsuki N, et al. Concomitant chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Head Neck.* 2015;1-5.
62. Grothey A. Reintroduction of oxaliplatin: a viable approach to the long-term management of metastatic colorectal cancer. *Oncology.* 2010;79(5-6):389-99. PubMed PMID: 21447970.
63. Won HS, Lee YS, Jeon EK, Hong SH, Kang JH, Kim YS, et al. Clinical outcome of induction chemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014;34(10):5709-14. PubMed PMID: 25275078.
64. Milroy R. A randomised clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small cell lung cancer. West of Scotland Lung Cancer Research Group, and the Aberdeen Oncology Group. *Br J Cancer.* 1993;68(4):813-8. PubMed PMID: 8398713.
65. Schuurhuis GJ, Van Heijningen TH, Cervantes A, Pinedo HM, de Lange JH, Keizer HG, et al. Changes in subcellular doxorubicin distribution and cellular accumulation alone can largely account for doxorubicin resistance in SW-1573 lung cancer and MCF-7 breast cancer multidrug resistant tumour cells. *Br J Cancer.* 1993;68(5):898-908. PubMed PMID: 8105865.
66. Passerini N, Perissutti B, Albertini B, Voinovich D, Moneghini M, Rodriguez L. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. *J Control Release.* 2003;88(2):263-75.
67. Abdallah HM, Al-Abd AMA, El-Dine RS, El-Halawany AM. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: a review. *J Adv Res.* 2015;6(1):45-62.
68. Dong X, Mumper RJ. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. [Nanomedicine](#). 2010;5(4):597-615.
69. Zhao D, Liu N, Shi K, Wang X, Wu G. Preparation of a multifunctional verapamil-loaded nano-carrier based on a self-assembling PEGylated prodrug. [Colloids Surf B Biointerfaces](#). 2015;135:682-8.
70. Eid SY, El-Readi MZ, Wink M. Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. *Phytomedicine.* 2012;19(14):1288-97.
71. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011;147(4):742-58. PubMed PMID: 22078876.
72. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57. PubMed PMID: 4561027.
73. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90. PubMed PMID: 10611963.

74. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998;23(2):74-9. PubMed PMID: 9538693.
75. Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia.* 2001;15(7):1022-32. PubMed PMID: 11455969.
76. Grivicich I, Regner A, Rocha ABD. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53(3):335-43.
77. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6. PubMed PMID: 11048727.
78. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000;10(9):369-77. PubMed PMID: 10932094.
79. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):19-26. PubMed PMID: 10739647.
80. Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol.* 2003;22(1):15-20. PubMed PMID: 12469180.
81. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000;6(5):513-9. PubMed PMID: 10802706.
82. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305(5684):626-9. PubMed PMID: 15286356.
83. Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000;20(15):5680-9. PubMed PMID: 10891504.
84. Gottlieb RA. Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept.* 2001;10(3-4):147-61. PubMed PMID: 11351125.
85. Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res.* 1999;434(3):243-51. PubMed PMID: 10486595.
86. Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biol Chem.* 2004;385(6):449-64. PubMed PMID: 15255176.
87. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644(2-3):83-94. PubMed PMID: 14996493.
88. Seino K-i, Setoguchi Y, Ogino T, Kayagaki N, Akiba H, Nakano H, et al. Protection against fas-mediated and tumor necrosis factor receptor 1-mediated liver injury by blockade of FADD without loss of nuclear factor-kb activation. *Ann Surg.* 2001;234(5):681-8. PubMed PMID: PMC1422094.
89. Kim JH, Choi YW, Park C, Jin CY, Lee YJ, Park J, et al. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by gomisin N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schizandra chinensis* Baill. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(3):807-13. PubMed PMID: 20034537.
90. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2011 Sep;18(9):1414-24. PubMed PMID: 21415859.
91. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277-88. PubMed PMID: 12001989.
92. Xing MM, Ma H, Liu Y, Shi M, Shao X, Zhong W, et al. Theranostic pH responsive doxorubicin loaded nanoparticles inducing active targeting and apoptosis for advanced gastric cancer. *Biomacromolecules.* 2015;3-36. PubMed PMID: 26477267.
93. Paul M, Hemshekhar M, Thushara RM, Sundaram MS, NaveenKumar SK, Naveen S, et al. Methotrexate promotes platelet apoptosis via JNK-Mediated mitochondrial damage: alleviation by N-Acetylcysteine and N-Acetylcysteine Amide. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127558. PubMed PMID: 26083398.
94. Zarogoulidis P, Petanidis S, Kioseoglou E, Domvri K, Anastakis D, Zarogoulidis K. MiR-205 and miR-218 expression is associated with carboplatin chemoresistance

- and regulation of apoptosis via Mcl-1 and Survivin in lung cancer cells. *Cell Signal*. 2015;27(8):1576-88. PubMed PMID: 25917317.
95. Kim SH, Jakhar R, Kang SC. Apoptotic properties of polysaccharide isolated from fruiting bodies of medicinal mushroom *Fomes fomentarius* in human lung carcinoma cell line. *Saudi J Biol Sci*. 2015;22(4):484-90. PubMed PMID: 26150756.
 96. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol*. 2011;4(6):687-99. PubMed PMID: 21375717.
 97. Cragg GM, Newman DJ. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9(12):2783-97. PubMed PMID: 11093353.
 98. Ambroz M, Hanusova V, Skarka A, Bousova I, Kralova V, Langhasova L, et al. Essential oil from *myrica rubra* leaves potentiated antiproliferative and prooxidative effect of doxorubicin and its accumulation in intestinal cancer cells. *Planta Med*. 2015. PubMed PMID: 26485638.
 99. Surmeli Z, Gursoy P, Erdogan AP, Bozkurt E, Atmaca H, Uzunoglu S, et al. Combination of zoledronic acid and serine/threonine phosphatase inhibitors induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cells via inhibition of PI3K/Akt pathway. *Tumour Biol*. 2015. PubMed PMID: 26462835.
 100. Duarte VM, Han E, Veena MS, Salvado A, Suh JD, Liang LJ, et al. Curcumin enhances the effect of cisplatin in suppression of head and neck squamous cell carcinoma via inhibition of IKKbeta protein of the NFkappaB pathway. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(10):2665-75. PubMed PMID: 20937593.
 101. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet]. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos - CATEF. 2015 [cited 2015 May 9]. Available from: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>.
 102. Oršolić N. A review of propolis antitumor action in vivo and in vitro. *J ApiProduct ApiMedical Sci*. 2010;2(1):1-20.
 103. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001;15(7):561-71. PubMed PMID: 11746834.
 104. Frion-Herrera Y, Diaz-Garcia A, Ruiz-Fuentes J, Rodriguez-Sanchez H, Sforcin JM. Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67(10):1448-56. PubMed PMID: 26206395.
 105. Markiewicz-Zukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:50. PubMed PMID: 23445763.
 106. Orsolic N, Car N, Lisicic D, Benkovic V, Knezevic AH, Dikic D, et al. Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on ehrlich ascites tumor in mice. *J Pharm Sci*. 2013;102(12):4395-405. PubMed PMID: 24136132.
 107. Nogueira-Neto PA. A criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Noqueirapis; 1997.
 108. Cunha IBS SA, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc*. 2004;15:964-70.
 109. Araújo MJAN, Conti B, Fernandes Júnior A, Trusheva B, Vassya B, Sforcin JM. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. *J Mol Pathophysiol*. 2015;4(1):12-20.
 110. Freitas MO, Ponte FAF, Lima MAS, Silveira ER. Flavonoids and triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. *J Braz Chem Soc*. 2008;19(3):532-5.

111. Cinegaglia NC, Bersano PRO, Araújo M, Búfalo MC, Sforcin JM. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013(2013):737386. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/737386>.
112. da Cunha MG, Franchin M, de Carvalho Galvão LC, de Ruiz AL, de Carvalho JE, Ikegaki M, et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:23.
113. Saleem M, Murtaza I, Tarapore RS, Suh Y, Adhami VM, Johnson JJ, et al. Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting β -catenin signaling. *Carcinogenesis*. 2009;30(5):808-17.
114. Murtaza I, Saleem M, Adhami VM, Hafeez BB, Mukhtar H. Suppression of cFLIP by Lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-Mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69(3):1156-65.
115. Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. Lupeol targets liver tumor-initiating cells through phosphatase and tensin homolog modulation. *Hepatology*. 2011;53(1):160-70.
116. Barros FW, Bandeira PN, Lima DJ, Meira AS, de Farias SS, Albuquerque MR, et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(3):1268-76.
117. Seong YA, Shin PG, Kim GD. Anacardic acid induces mitochondrial-mediated apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma cells. *Int J Oncol*. 2013;42(3):1045-51.