

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

# THAIS PETROCHELLI BANZATO

## ATIVIDADE ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIA DA PRÓPOLIS VERMELHA E DE SEUS COMPOSTOS BIOATIVOS

ANTICANCER AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF RED PROPOLIS AND ITS BIOACTIVE COMPOUNDS

> Campinas 2018

### THAIS PETROCHELLI BANZATO

### ATIVIDADE ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIA DA PRÓPOLIS VERMELHA E DE SEUS COMPOSTOS BIOATIVOS

### ANTICANCER AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF RED PROPOLIS AND ITS BIOACTIVE COMPOUNDS

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e estrutural.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Ph.D. in Cellular and Structural Biology.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA THAIS PETROCHELLI BANZATO E ORIENTADA PELO DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

ORIENTADOR: DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO CO-ORIENTADORA: DR. DÉBORA BARBOSA VENDRAMINI COSTA

> Campinas 2018

#### Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/24416-1

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B228a	Banzato, Thais Petrochelli, 1987- Atividade anticâncer e anti-inflamatória da própolis vermelha e de seus compostos bioativos / Thais Petrochelli Banzato. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.
	Orientador: João Ernesto de Carvalho. Coorientador: Débora Barbosa Vendramini Costa. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Própolis vermelha. 2. Próstata - Câncer. 3. Inflamação. I. Carvalho, João Ernesto, 1954 II. Vendramini-Costa, Débora Barbosa, 1984 III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Anticancer and anti-inflammatory activity of red propolis and its bioactive compounds Palavras-chave em inglês: Red propolis Prostate - Cancer Inflammation Área de concentração: Biologia Celular Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: João Ernesto de Carvalho [Orientador] Bruno Bueno Silva Rejane Maira Góes Giovanna Barbarini Longato Patrícia da Silva Melo Data de defesa: 31-08-2018 Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 31 de agosto de 2018.

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Maira Góes

Prof. Dr. Bruno Bueno Silva

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia da Silva Melo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovanna Barbarini Longato

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Presidente da comissão julgadora)

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico esse trabalho aos meus pais que me ensinaram a importância do estudo e me fizeram forte para seguir meus sonhos.

#### Agradecimentos

A Deus por guiar, intuir e me dar forças para lutar e aprender.

Agradeço meus pais, minha irmã Juliana e meu marido Henrique por estarem presentes em todos os passos até aqui, eles acreditaram em mim muitas vezes em que eu não consegui acreditar. Todas as viagens em busca de respostas, incertezas do trabalho e os incentivos financeiros para que eu continuasse pesquisando mesmo sem bolsa.

À minha família por acreditar que uma menina vinda da periferia podia sonhar com uma universidade pública e financiarem meus estudos (Mainha, Mané, Tio Maurício).

Ao meu orientador Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho por confiar em mim e no meu trabalho, por abrir as portas da UNICAMP e do CPQBA, pela liberdade para realizar todas as minhas idéias e me dar oportunidade de fazer a o que eu amo.

A minha co-orientadora Débora que fez o possível e o impossível para me ensinar sobre ciência. Agradeço por lutar pelo meu trabalho e pela minha carreira tanto quanto eu, por me incentivar a conhecer as pesquisas e os laboratórios nos EUA e por ser minha amiga.

Agradeço a todos do CPQBA que me receberam com muito amor e por ser minha segunda casa em Campinas. Agradeço a Sica por todo suor doado em prol da ciência. Aninha por me ensinar a usar a cultura celular, Mary Ann por abrir seu laboratório de fitoquímica, Karin pelos ensinamentos com animais e Ana Possenti pelo carinho. A todos os amigos que conquistei nesse laboratório ao longo desses anos que me ajudaram em tantos experimentos e delineamentos.

Agradeço a todas as amigas que fiz nesse tempo de doutorado. Paula Monteiro por sempre me ouvir e se dedicar a me ensinar desde o que é uma sílica até morte celular. A Giovana Fiorito por ser minha parceira incansável. A Lari pelo carinho e por ter me apresentado a correção do vestibular. A Fabi por estar comigo em todos os testes em animais.

Ao Prof. Dr. Severino (ESALQ) por confiar em mim e me dar a própolis vermelha para estudar, por abrir seu laboratório e me ensinar sobre fitoquímica. Agradeço a todos da Esalq que trabalharam ao meu lado (Fernanda, Adna e Ivani).

Ao prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli (IQ/UNICAMP) por me ensinar tudo que sei sobre compostos químicos, por me ouvir e por entender a arte de ensinar. Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck (USP de São Carlos) por abrir as portas do seu laboratório e por me presentear com a amizade de sua aluna Dra. Juliana Gubiani que me ajudou desde o início e foi capaz de doar tanto de seu tempo em busca dos nossos compostos puros.

A Dra. Raquel Frenedoso por sempre me impulsionar na vida pessoal e profissional, me ensinar, por estar presente e se dedicar tanto ao meu trabalho. Agradeço por ter me apresentado a Profa. Dra. Valéria Quitete (IB/UNICAMP) e seu laboratório onde realizei todos os estudos do câncer de próstata e agradeço a confiança, parceria e ajuda de todos os membros do laboratório de Biologia da Reprodução principalmente a Dra. Larissa Kido.

A Dra. Edna Cukierman por me receber em seu laboratório no Fox Chase Cancer Center e ao Dr. Ralph Francescone por me receber em seu país e me ensinar tanto.

As minhas amigas de república Bruna e Lívia, que compartilharam todos meus momentos do doutorado e que foram minhas irmãs, amigas e confidentes.

A minha melhor amiga Luana que mesmo morando na Alemanha sempre se fez tão presente, obrigada por tanto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural especialmente a Liliam Panagio, que sempre esteve disposta em ajudar.

Aos membros titulares e suplentes da banca de defesa por aceitarem o convite e contribuírem com essa pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Doutorado Regular e de Estágio de Pesquisa no Exterior, processos nº 2013/24416-1.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte ao meu orientador.

E um agradecimento especial a todos os animais de laboratório utilizados nesse estudo que deram a vida pela ciência e foram utilizados com muito respeito.

Esse espaço é pequeno para demonstrar minha gratidão a tantas pessoas que me doaram tempo, expertise, ombro amigo e recursos. Defendo esse trabalho me sentindo orgulhosa e forte por poder contar com o melhor de cada um.

"Eu sou é eu mesmo. Divirjo de todo o mundo... Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa". **Guimarães Rosa** 

#### **RESUMO**

O microambiente tumoral oferece múltiplos alvos para a terapia anticâncer e o co-tratamento com medicamentos que modifiquem esse microambiente pode promover uma resposta adjuvante na quimioterapia agindo em alvos específicos. A Própolis Vermelha Brasileira apresenta uma composição química única enriquecida em isoflavonoides e a combinação entre fármacos anticâncer e extratos ou compostos derivados de própolis vermelha pode oferecer uma vantagem significativa e eficaz na sensibilização da monoterapia, superando a resistência induzida por fármacos em pacientes com câncer. Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos antitumorais do extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) in vitro e in vivo, juntamente com sua atividade anti-inflamatória e avaliação de mecanismos de morte celular. A atividade antiproliferativa in vitro foi avaliada em diferentes linhagens celulares tumorais humanas e o aprofundamento dos mecanismos de ação in vitro foram realizados na linhagem PC-3 (adenocarcinoma prostático humano). A atividade antitumoral in vivo do EEPV foi analisada através do modelo de tumor sólido de Ehrlich em camundongos Balb / C machos, tratados por via oral com EEPV (50, 100 e 200 mg / kg) e em camundongos transgênicos para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP) que foram tratados com EEPV (50 mg/Kg) cinco vezes por semana durante 30 dias (8 a 12 semanas de idade). A atividade antiinflamatória foi avaliada pelo edema de orelha induzido por óleo de cróton e pelo edema de pata induzido por carragenina e por diferentes agentes (composto 48/80, bradicinina, prostaglandina E<sub>2</sub>) em camundongos Balb / C machos. A ativação de neutrófilos foi avaliada através da atividade de mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Para o fracionamento bioguiado, o EEPV passou por diferentes métodos de fracionamento e purificação (partição líquido-líquido, coluna seca, coluna aberta com C<sub>18</sub>, HPLC preparativo, HPLC analítico e RMN), sendo que as frações obtidas em cada passo foram submetidas ao teste para avaliação da atividade antiproliferativa in vitro. O EEPV promoveu inibição do crescimento e citotoxicidade de maneira dependente da concentração, sem seletividade para um tipo tumoral, o que indica que seus efeitos são direcionados a um processo tumoral comum a diferentes tipos de tumor. A investigação do mecanismo de ação em linhagem de próstata (PC-3) revelou que o EEPV foi capaz de inibir a proliferação celular, induzindo a interrupção do ciclo celular na fase G1 e induzindo morte celular por uma combinação de apoptose e necroptose. O EEPV foi capaz de diminuir o crescimento do tumor solido de Ehrlich nas três doses testadas, e nos animais TRAMP, o EEPV retardou a progressão do adenocarcinoma prostático, reduziu a proliferação de células epiteliais, induziu apoptose e diminuiu a expressão de COX-2. Além disso, nos modelos de inflamação, o EEPV apresentou atividade dose-dependente no edema de pata induzido por carragenina, com a maior dose (200 mg / kg) inibindo a formação de edema desde as primeiras horas até o final do experimento. O pré-tratamento com EEPV (200 mg / kg) inibiu significativamente a formação de edema de pata induzida pelos compostos 48/80, bradicinina e PGE2, evidenciando seus efeitos sobre mediadores vasoativos, e a inibição da ativação de neutrófilos foi confirmada pelo edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Por fim, através da avaliação dos dados físico-químicos e espectrométricos desse estudo foi possível o isolamento e a determinação estrutural de uma molécula inédita, que será descrita pela primeira vez na literatura. Sendo assim, as atividades antitumorais e anti-inflamatórias combinadas sugerem que o EEPV atua em múltiplas características do câncer, afetando diretamente a proliferação de células tumorais e o ambiente tumoral, possivelmente modulando a tumorigênese e a inflamação associada ao tumor.

#### ABSTRACT

The tumor microenvironment offers multiple targets for anticancer therapy and the cotreatment with drugs that modify this environment may provide an adjuvant response to chemotherapies with specific targets. Brazilian Red Propolis presents a unique chemical composition enriched in isoflavonoids and the combination between anticancer drugs and extracts or compounds derived from red propolis could offer a significant and effective advantage in the sensitization of monotherapy, overcoming drug-induced resistance in cancer patients. The objective of this study was to evaluate the antitumor effects of the Ethanolic Extract of Red Propolis (EERP) in vitro and in vivo, together with its anti-inflammatory activity and evaluation of mechanisms of cell death. The *in vitro* antiproliferative activity was evaluated in different human cancer cell lines and the in vitro mechanisms of action were further explored in the PC-3 line (human prostatic adenocarcinoma). In vivo antitumor activity was analyzed by the Ehrlich solid tumor model in male Balb / C mice, orally treated with EERP (50, 100 and 200 mg / kg) and in transgenic adenocarcinoma of the prostate (TRAMP) mice who were treated with EERP (50 mg / kg) five times a week for 30 days (8 to 12 weeks of age). The anti-inflammatory activity was evaluated through carrageenan-induced paw edema and through different agents (compound 48/80, bradykinin, prostaglandin E<sub>2</sub>) in male Balb / C mice. Neutrophil activation was assessed by myeloperoxidase activity in croton oilinduced ear edema. For Bioassay-guided fractionation, EERP has gone through different fractionation and purification methods (liquid-liquid partition, dry column, C<sub>18</sub> open column, preparative HPLC, analytical HPLC and RMN), and the fractions obtained at each step were evaluated in vitro for antiproliferative activity in cancer cell lines. EERP promoted growth inhibition and cytotoxicity in a concentration-dependent way, without selectivity for a tumor type, indicating that its effects are directed to a tumor process common among all tumor cells tested. The investigation of the mechanism of action in prostate cell line (PC-3) revealed that the EERP inhibited cell proliferation, inducing cell cycle arrest in the G1 phase and inducing cell death by a combination of apoptosis and necroptosis. EERP was able to decrease Ehrlich solid tumor growth in the three doses tested, and in TRAMP animals, EERP treatment delayed the prostatic adenocarcinoma progression, reduced epithelial cells proliferation, induced apoptosis, and decreased COX-2 expression. In the inflammation models, EERP showed dose-dependent activity in the carrageenan-induced paw edema, with the highest dose (200 mg/kg) inhibiting the formation of edema within the first hours until the end of the experiment. Pre-treatment with EERP (200 mg/kg) significantly inhibited paw edema formation induced by compound 48/80, bradykinin and PGE2, illustrating their effects on vasoactive mediators. Moreover, the inhibition of neutrophil activation was confirmed using the croton oil-induced ear edema in mice. Finally, through the evaluation of physicochemical and spectrometric data of this study it was possible for the isolation and structural determination of an unpublished molecule, which will be described for the first time in the literature. Thus, the combined antitumoral and anti-inflammatory activities suggest that EERP targets multiple hallmarks of cancer, directly affecting tumor cell proliferation and the tumor environment, modulating tumorigenesis possibly through the reduction of tumor-associated inflammation.

#### ÍNDICE DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

Akt: (Protein Kinase B) - proteína quinase B **AR:** (Androgen Receptor) - receptor de andrógeno **B16F10:** linhagem celular de melanoma murino CAPE: (Caffeic Acid Phenethyl Ester) - éster fenetílico do ácido cafeico CCD: Cromatografia em Camada Delgada **CDK:** (*Cyclin Dependent Kinase*) - quinases dependentes de ciclinas **c-Myc:** *Myelocytomatosis viral oncogene* COX: (Cyclooxygenase) - ciclo-oxigenase CXC: (chemokine) - quimiocina **CXCL1 / KC:** chemokine ligand 1 CXCL2 / MIP-2: chemokine ligand 2 / macrophage inflammatory protein 2 **DHEA:** dehidroepiandrosterona **DMBA:** 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene DMSO: Dimetilsulfóxido DNA: (Deoxyribonucleic Acid) - ácido desoxirribonucleico DU145: células humanas de câncer de próstata E.coli : Escherichia coli **EEP:** Extrato Etanólico da Própolis Vermelha **ESI:** *electrospray* FR: Fase Reversa HCT-116: linhagem celular de câncer de cólon HeLa: linhagem celular de câncer cervical humano Hep-2: linhagem celular de câncer epidermóide da laringe humana HL60: linhagem celular de leucemia promielocítica aguda HMG-CoA: 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA HPLC: (High performance liquid chromatography) - cromatografia líquida de alta eficiência. HRESI-MS: (High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry) - espectrometria de massas de alta resolução no modo negativo ICAM-1: (Intercellular Adhesion Molecule-1) - molecula de adesão intercelular **IL-1** $\beta$ : (Interleukin 1 $\beta$ ) - interleucina 1 $\beta$ IL-6: (Interleukin 6) - interleucina 6 IL-8: (Interleukin 6) - interleucina 6 **INCA:** Instituto Nacional do Câncer iNOS: óxido-nítrico sintase induzida K562: linhagem celular de leucemia mielóide crônica humana LC50: (Lethal Concentration 50) - concentração necessária para matar 50% das células

LNCap: linhagem celular de câncer de próstata dependente de hormônio

LPS: lipopolissacarídeo

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCF-7: linhagem celular de câncer de mama humano

**MEC:** matriz extracelular

MS: (mass spectrometry) - espectrometria de massas

NCI: National Cancer Institute

**NF-κB:** *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* 

NIP: Neoplasia Intraepitelial Prostática

OVCAR-8: linhagem celular de câncer de ovário

P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa

PANC-1: linhagem celular de câncer de pâncreas humano

PC-3: linhagem celular de câncer de próstata humano

**PGE2:** (*Prostaglandin E*<sub>2</sub>) - prostaglandina E<sub>2</sub>

pNF-кB: phosphorylated nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**PVB:** Própolis Vermelha Brasileira

RC58T / h / SA # 4: células humanas de tumor maligno primário de próstata

RMN: ressonância magnética nuclear

RNS: (reactive nitrogen species) - espécies reativas de nitrogênio

ROS: (reactive oxigen species) - espécies reativas de oxigênio.

S. aureus: Staphylococcus aureus

S. mutans: Streptococcus mutans

SF-29: linhagem celular de glioblastoma

SFB: Sulforrodamina B

TCA: (Trichloroacetic Acid) - ácido tricloroacético

**TGF-** $\beta$ : (*Transforming Growth Factor-* $\beta$ ) - *fator de transformação do crescimento* 

**TGI:** (*Total Growth Inhibition*) - concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular

**TNF-a:** (*Tumor Necrose Factor-a*) - fatores de necrose tumoral  $\alpha$ 

**TRAIL:** (*TNF-related Apoptosis-inducing ligand*) - ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral TNF

**TRAMP:** transgenic adenocarcinoma of mouse prostate

UV: (Ultraviolet) - radiação ultraviolet

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO1	4
1.1 CÂNCER E INFLAMAÇÃO14	
1.2 PRODUTOS NATURAIS E CÂNCER17	
1.3 PRÓPOLIS	
1.4 PRÓPOLIS VERMELHA20	
1.5 CÂNCER DE PRÓSTATA25	
2.JUSTIFICATIVA	0
3. OBJETIVOS	1
3.1 OBJETIVOS GERAIS	
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
CAPÍTULO I3	2
Atividades antitumoral e anti-inflamatória in vivo do extrato etanólico da própolis vermelha	
CAPÍTULO II6	2
Efeito do extrato etanólico da própolis vermelha no câncer de próstata.	
CAPÍTULO III9	6
Biomonitoramento do extrato etanólico da própolis vermelha através de teste de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> em células tumorais e identificação do composto isolado.	
CONCLUSÃO GERAL14	0
REFERÊNCIAS14	1
ANEXOS14	8

#### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 CÂNCER E INFLAMAÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças relacionadas caracterizadas por um crescimento celular desordenado (NCI, 2018). A etiologia do câncer é muito variada, podendo ser de origem externa ou interna ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas envolvem estímulos do meio ambiente, hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2018). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), em 2012, houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes no mundo. Estima-se, para o Brasil, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer em 2018, sendo os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes (INCA, 2018).

Diferentes tipos de câncer possuem em comum alterações fisiológicas que se desenvolvem a partir da célula tumoral, e cada modificação fisiológica adquirida confere às células tumorais um tipo de vantagem, constituindo desta forma as características (hallmarks) do câncer, que são: a autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (Hanahan & Weinberg , 2000). Além dessas características, há quatro processos pró-tumorais, que são: instabilidade genômica, inflamação associada ao tumor, reprogramação do metabolismo celular, para suportar o contínuo crescimento e proliferação celular, e a evasão da destruição pelo sistema imune (Hanahan & Weinberg , 2011).

O câncer é uma doença causada por mudanças nos genes que controlam o funcionamento de nossas células, especialmente como elas crescem e se dividem. Essas alterações podem ser herdadas ou podem surgir como resultado de erros na divisão celular ou por danos ao DNA causados por certas exposições ambientais que incluem substâncias como produtos químicos, cigarro, alimentação e radiação (Chen *et al.*, 2015). Cerca de 90% dos casos de câncer estão associados a mutações somáticas e fatores ambientais, 25% deles são ligados a infecções crônicas, 30% podem ser atribuídos ao fumo e inalação de poluentes (tais como a sílica e amianto) e 35% podem ser atribuídos à dieta (20% de incidência ligada à obesidade) (Aggarwal *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2010). A exposição constante a um ou mais desses fatores favorece o desenvolvimento do processo carcinogênico, que é dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão tumoral (Karin e Greten, 2005).

Distúrbios genéticos associados a mutações em genes supressores de tumor, metilação de DNA e modificações pós-traducionais são necessários para a transformação de células normais em células cancerígenas (Fernandes *et al.*, 2015). Nas últimas duas décadas, muitos oncogenes e genes supressores de tumor foram identificados, possibilitando o desenvolvimento de novos agentes antitumorais e métodos terapêuticos. A sobrevida de pacientes com câncer foi significativamente prolongada ao passo que, a recaída ou recorrência do tumor quase sempre é desenvolvida, agregada muitas vezes a resistência às drogas inicialmente efetivas (Chen *et al.*, 2015). Os tratamentos antineoplásicos convencionais frequentemente causam alterações estruturais e funcionais do microambiente tumoral, que contribuem para a resistência adquirida e comprometem gravemente os desfechos clínicos por geração de nichos de proteção ao câncer (Hui & Chen, 2015).

O ambiente tumoral é composto por elementos estruturalmente e funcionalmente essenciais como matriz extracelular, fibroblastos, células endoteliais, células neuroendócrinas, células adiposas, redes vasculares sanguíneas e linfáticas, células do sistema imune e inflamatórias, que regulam o comportamento e co-evoluem com as células tumorais (Werb & Lu, 2015). Evidências crescentes indicam que modular o microambiente do tumor poderia complementar o tratamento tradicional e melhorar os resultados terapêuticos para essas neoplasias malignas, pois ele atua como um fator-chave em múltiplos estágios de progressão da doença, particularmente resistência local, escape do sistema imunológico e metástase (Chen *et al.*, 2015).

O câncer é uma doença de comunicação e circuitos, onde as células mutantes, que expandiram cronicamente, trazem consigo vantagens adquiridas e coordenam seu ambiente através de sinais e conexões, intrínsecas e extrínsecas, em um circuito orientado para expansão e sobrevivência (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Alterações sucessivas ocorrendo no local do tumor durante sua progressão assemelham-se à inflamação crônica, sendo esse processo descrito com a metáfora de que "tumores são feridas que não cicatrizam", o que parece ser amplamente orquestrado pelo tumor e parece promover a sobrevivência dele (Grivennikov *et al.*, 2010).

As respostas inflamatórias desempenham papéis decisivos em diferentes fases do desenvolvimento do tumor, incluindo a iniciação, promoção, a conversão maligna, invasão e metástase. A inflamação também afeta a vigilância imunitária e as respostas à terapia (Grivennikov *et al.*, 2010). Essas respostas acontecem através da ativação de oncogenes, indução de mutações, perda de mecanismos de controle do ciclo celular e de reparação do DNA, gerando uma instabilidade genômica que, em conjunto com angiogênese e remodelação

do tecido, contribui para o desenvolvimento de cerca de 1 em 4 casos de câncer no mundo (Fernandes *et al.*, 2015). Nesse processo, a inflamação atua como um processo facilitador, pois supre o ambiente tumoral com moléculas bioativas como fatores de crescimento, de sobrevivência, pró-angiogênicos, enzimas que modificam a matriz extracelular, entre outros (Hanahan & Weinberg, 2011).

A relação câncer-inflamação se dá por duas vias: intrínseca, caracterizada pela ocorrência de danos ao DNA, instabilidade cromossômica e alterações epigenéticas que, consequentemente, conduzem à expressão de oncogenes. Já a via extrínseca é constituída por sinais inflamatórios provenientes de infecções e doenças autoimunes (Kundu & Surh, 2012). Durante a inflamação crônica ocorre uma produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). O estresse oxidativo funciona como um efetor químico da carcinogênese, pois tem caráter genotóxico, podendo danificar o DNA. Além disso, esse processo ativa mediadores que vão aumentar a resposta inflamatória, tais como citocinas, quimiocinas, radicais livres, prostaglandinas, fatores de crescimento e enzimas como ciclo-oxigenase (COX) e metaloproteinases da matriz, que podem induzir alterações genéticas e epigenéticas, que resultam em alterações nas vias críticas responsáveis pela manutenção da homeostase celular, conduzindo ao desenvolvimento e progressão de câncer (Chai *et al.*, 2015; Vendramini-Costa, & Carvalho, 2012).

A ativação destas cascatas pró-inflamatórias favorece o aumento da proliferação celular, a evasão da apoptose, invasão, metástases e a angiogênese, sendo essas características bem estabelecidas do desenvolvimento cancerígeno (Chai *et al.*, 2015). Entretanto, a inflamação não atua apenas no processo de origem do tumor. Após o início do tumor, as neoplasias malignas sólidas são capazes de recrutar células imunitárias e inflamatórias e de regular os mediadores inflamatórios, que contribuirão para seu crescimento, nutrição e expansão (Grivennikov *et al.*, 2010; Vendramini-Costa, & Carvalho, 2012).

Dessa forma, o ambiente tumoral, por ser um componente determinante na formação e manutenção do tumor, oferecendo múltiplos alvos para a terapia anticâncer, entre eles a inflamação associada ao tumor (Housman *et al.*, 2014). Porém, apesar de existirem inúmeros alvos, há muito a ser explorado em termos de terapia, especialmente no que diz respeito a resistência e toxicidade do tratamento. A resistência adquirida contra drogas usadas no tratamento do câncer é um fenômeno complexo que é influenciado pela inativação e alteração do alvo do fármaco, reparo do dano ao DNA, inibição da morte celular, microambiente tumoral, heterogeneidade celular, efeitos epigenéticos ou qualquer combinação desses

mecanismos. A toxicidade apresentada pela maioria das drogas disponíveis na quimioterapia do câncer é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, pois a maioria deles tem como alvo moléculas envolvidas em processos proliferativos, que acabam por atingir também células não tumorais. O paradigma atual afirma que a terapia combinada deve ser a melhor opção de tratamento, porque deve prevenir o desenvolvimento de resistência a drogas e atingir diferentes processos relacionados ao desenvolvimento tumoral, podendo ter potencialmente mais eficácia do que qualquer droga isolada.

#### **1.2 PRODUTOS NATURAIS E CÂNCER**

A natureza tem sido fonte de produtos medicinais para o tratamento de um largo espectro de doenças há milênios, acompanhando a história da humanidade (Cragg *et al.*, 2014). Os primeiros registros escritos sobre aplicações medicinais de plantas datam de 2600 a.C. e relatam a existência de um sofisticado sistema medicinal na Mesopotâmia, compreendendo cerca de 1000 medicamentos derivados de plantas. Até o início do século XIX, as plantas medicinais só foram aplicadas em uma base empírica, sem conhecimento mecanicista sobre suas atividades farmacológicas ou constituintes ativos (Atanasov *et al.*, 2016). Com o aperfeiçoamento dos métodos de isolamento, identificação e síntese durante o último século, muitas drogas foram desenvolvidas a partir de uma variedade de espécies vegetais, animais e de microrganismos (Cragg & Newman, 2009) como é o caso dos alcaloides (por exemplo, quinina, cafeína, nicotina, codeína, atropina, colchicina, cocaína, capsaicina) que puderam ser isolados de suas fontes naturais.

A diversidade estrutural, no entanto, não é a única razão pela qual os produtos naturais são de interesse para o desenvolvimento de drogas. Uma característica adicional importante é que eles possuem muitas vezes atividades biológicas altamente seletivas e específicas com base em mecanismos de ação. Dois exemplos excelentes são a inibição da enzima 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA (HMG-CoA) exibida pelas estatinas tais como lovastatina, e a atividade sobre tubulinas conferida pelo paclitaxel, nenhum dos quais teria sido descoberto sem o uso de produtos naturais e investigação de seus mecanismos de ação (Cragg & Newman, 2013).

As plantas têm sido fonte de novas drogas anticâncer há muitos anos. Na área do tratamento de câncer, cerca de 65% dos quimioterápicos são derivados ou inspirados em produtos naturais e apenas 35% são sintéticas. Em contraste, no caso de tratamentos de processos inflamatórios, apenas 27% das moléculas utilizadas são de origem natural e/ou inspiradas na natureza e 73% são sintéticas (Newman & Cragg, 2012). Alguns exemplos de

agentes anticâncer provenientes de compostos naturais derivados de plantas, que se tornaram indispensáveis para a farmacoterapia moderna, são vimblastina e vincristina, etoposida, paclitaxel (Taxol), docetaxel, topotecano e irinotecano (Cragg *et al.*, 2014). Outros exemplos notáveis de produtos naturais usados como fármacos incluem a galantamina, inibidora da colinesterase que foi aprovada para o tratamento da doença de Alzheimer, e o importante agente antimalárico e potencial anticâncer artemisinina, originalmente obtido da erva chinesa tradicional *Artemisia annua* L. (Atanasov *et al.*, 2016).

Apesar do desenvolvimento da quimioterapia nos últimos 70 anos, ainda existe a necessidade de encontrar novas drogas para o tratamento desse conjunto de doenças que se desenvolve rapidamente, adquirindo resistência aos medicamentos anteriormente eficazes (Cragg *et al.*, 2014). A busca por novos agentes anticâncer exige uma pesquisa multidisciplinar envolvendo novas abordagens sendo que a natureza continua a desempenhar um papel fundamental neste processo (Cragg e Newman, 2013).

#### **1.3 PRÓPOLIS**

O termo "própolis" é de origem grega, resultante da junção da palavra "pro", que significa em "defesa de" e "polis", que denota "cidade". Sendo assim, a junção desses termos quer dizer "em defesa da cidade" e foi descrito no século XVI na França (Berreta *et al.*, 2017).

A própolis é um produto resinoso natural complexo coletado por abelhas (*Apis mellifera*) de brotos, botões florais, galhos e exsudatos de diversas fontes vegetais (Oldoni *et al.*, 2011). Uma vez coletado, este material é enriquecido com secreções salivares e enzimáticas da própria abelha, sendo utilizado como esterilizante e como uma barreira protetora contra insetos e microrganismos invasores em colmeias (Zizic *et al.*, 2013). Além disso, ela possui efeito esterilizante para que quando a abelha adentre a colmeia o ambiente esteja higienizado. Os insetos que porventura invadirem a colmeia são imediatamente picados, mortos, e embalsamados com a própolis, evitando dessa forma a decomposição desses organismos e contaminação dentro da colmeia (Zizic *et al.*, 2013; Berreta *et al.*, 2017).

As civilizações antigas consideravam os produtos apícolas como valiosos recursos terapêuticos em suas práticas medicinais. A história da medicina das civilizações assírias, chinesas, tibetanas, incas, persas, egípcias e também greco-romanas possui registros de formulações centenárias, incluindo própolis para tratar ou prevenir doenças (Berreta *et al.*, 2017). Suas propriedades medicinais estão relacionadas à grande variedade de substâncias de

origem vegetal presente em sua formulação, de forma isolada e / ou de forma sinérgica (Righi *et al.*, 2013).

A própolis tornou-se um tema de crescente interesse entre os pesquisadores devido à sua versatilidade biológica e aplicações médicas (Righi *et al.*, 2011; Franchi *et al.*, 2012) e são relatadas na literatura numerosas propriedades biológicas tais como atividade antioxidante (Li *et al.*, 2008), anti-herpética (Vynograd *et al.*, 2000), antibacteriana (Park *et al.*, 1998; Bueno-Silva *et al.*, 2013), antifúngica (Ota *et al.*, 2001), anti-inflamatória (Paulino *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008) e antitumoral (Watanabe *et al.*, 2011; Sforcin & Bankova, 2011; Sawicka *et al.*, 2012).

A composição química da própolis é variável, dependente da biodiversidade e de sua origem geográfica (Silva *et al.*, 2008), e mais de 300 compostos têm sido relatados em sua composição (Li *et al.*, 2008). Os compostos identificados são principalmente polifenóis, sendo que a classe principal é a dos flavonoides, acompanhados de ácidos fenólicos, aldeídos, aldeídos fenólicos e cetonas. Em geral, a própolis é composta por 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de alguns elementos essenciais, tais como magnésio, cálcio, ferro, níquel e zinco, bem como vitaminas (Chan *et al.*, 2012; Rufatto *et al.*, 2017).

Os tipos de própolis mais difundidos são própolis verde, álamo, vidoeiro, vermelho, mediterrâneo, clusia, pacífico, tunisiano, iraniano e egípcio, que são diferentes em origem geográfica e fonte vegetal (Oryan *et al.*, 2018). A cor da própolis é geralmente marromescura, mas ela pode ser encontrada em tons de verde, vermelho, preto e branco, dependendo das fontes de resina encontradas na área específica da colmeia. As abelhas reúnem o que precisam das fontes disponíveis; assim, a composição química da própolis varia consideravelmente de região para região, juntamente com a vegetação (Oryan *et al.*, 2018).

Devido à grande biodiversidade das áreas nativas protegidas no Brasil, que se tornam fontes valiosas de novas substâncias, é possível encontrar diferentes tipos de própolis em sua extensão territorial. Park *et al.* (2002) coletaram mais de 2 mil amostras de própolis brasileiras de diferentes regiões e estados e classificaram-nas em 12 tipos, com base em suas características físico-químicas. Após a identificação dos primeiros 12 tipos de própolis brasileiras brasileiras, um novo tipo foi descrito em 2007, a própolis vermelha (tipo 13) (Alencar *et al.*, 2007).

#### **1.4 PRÓPOLIS VERMELHA**

O 13º tipo de própolis, o achado mais recente, é a própolis vermelha brasileira (PVB). Esse novo tipo de própolis pode ser encontrado em colmeias localizadas no caule de arbustos de mangue e costas marítimas e fluviais nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia (Bueno-Silva *et al.*, 2016; Rufatto *et al.*, 2017). Na base de sua composição química única, estão os isoflavonoides, o que a diferencia de outros tipos de própolis e sugere novas potencialidades biológicas para este novo produto natural (Bueno-Silva *et al.*, 2016).

A origem botânica da própolis vermelha foi determinada por observação do comportamento das abelhas, e por comparação dos compostos fenólicos presentes no exsudato da planta e da própolis (Silva *et al.*, 2008). Verificou-se que a origem botânica desse novo tipo de própolis é a *Dalbergia ecastophyllum*, que é responsável pela cor vermelha da própolis, sendo que a abelha *Apis mellifera* recolhe o exsudado vermelho da superfície dos furos feitos por insetos no tronco da árvore para fabricar a própolis vermelha (Sena-Lopes *et al.*, 2018).

Os principais componentes químicos encontrados na PVB são classificados em grupos como: isoflavonas, flavonas, flavonóides, auronas, chalconas, pterocarpanos, xantonas, terpenos e taninos (Sena-Lopes *et al.*, 2018). Estudos recentes que buscaram caracterizar a própolis vermelha brasileira encontraram moléculas como formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, pinocembrina, vestitol, elemicina, isoelêmica, metil isoeugenol, metil eugenol, que são marcadores químicos dessa própolis e permitem diferenciá-la de outros tipos de própolis brasileiras (Mendonça *et al.*, 2015; Bueno-Silva *et al.*, 2016). Além disso, elementos inorgânicos como cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício, também são identificados em sua composição (Oryan *et al.*, 2018). A presença de dois pigmentos flavanóis denominados Retusapurpurina B e Retusapurpurina A conferem sua identidade característica vermelha (Rufatto *et al.*, 2017).

#### 1.4.1 Atividade antimicrobiana

Nas últimas décadas, a própolis ganhou ampla aceitação na medicina tradicional em várias partes do mundo. Esse interesse disseminado pela própolis em vários países estimulou um grande número de estudos considerando as propriedades químicas e biológicas da própolis (Berreta *et al.*, 2017)

A notável atividade antimicrobiana, contra diferentes microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários, é complexa e pode ser atribuída à presença de vários compostos bioativos, principalmente às isoflavonas (Freires *et al.*, 2016). A atividade antimicrobiana da

própolis vermelha foi avaliada contra *S. mutans* e *S. aureus* onde a fração clorofórmica foi a mais ativa (Alencar *et al.*, 2007). Sena-Lopes *et al.*, (2018) avaliaram o óleo essencial da própolis vermelha (EOP). Sua exposição inibiu o crescimento, e na maior concentração, matou completamente *Trichomonas vaginalis*. Extratos etanólicos de própolis vermelha apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus subtilis*) e bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Estes resultados são muito interessantes, uma vez que a própolis verde não é ativa contra *E. coli e P. aeruginosa* (Berreta *et al* 2017).

A atividade descrita acima da PVB pode ser dividida em: danos citoplasmáticos na membrana, inibição da síntese do ácido nucleico, inibição do metabolismo energético e a inibição de ligação e formação de biofilmes (Freires *et al.*, 2016). Um efeito sinérgico da própolis vermelha com gentamicina também foi observado contra todas as cepas testadas de *P. Aeruginosa, E. coli* e *S. aureus* e os autores sugerem que a PVB pode ser usada como um adjuvante contra infecções bacterianas multirresistentes (Regueira *et al.*, 2017). Aplicações tópicas (800  $\mu$ g / mL), contendo neovestitol e vestitol, isolados da PVB, prejudicaram o acúmulo de biofilmes de *S. mutans*. Além disso, a própolis vermelha mostrou-se tão eficaz quanto o flúor na redução do desenvolvimento de lesões cariosas *in vivo* (Bueno-Silva *et al.*, 2013).

Já o mecanismo antifúngico da própolis vermelha em leveduras parece estar relacionado à ação sobre a parede celular dos fungos e permeabilidade de membrana (Freires *et al.*, 2016). No estudo de das Neves *et al.*, (2016) foi realizado um fracionamento bioguiado de duas amostras de própolis vermelha brasileira para determinar os componentes responsáveis por sua atividade antimicrobiana. Seus resultados mostraram que tanto a resina bruta em pó quanto o extrato bruto etanólico da própolis inibiram o crescimento de 12 amostras de *Candida* e a isoflavona isolada da formonetina inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados. Pippi *et al.* (2015) identificaram que a sinergia entre uma fração enriquecida em benzofenona obtida da própolis vermelha brasileira e o fluconazol resulta em uma modalidade terapêutica alternativa no tratamento de infecções relacionadas à *Candida sp.* 

#### 1.4.2 Atividade anti-inflamatória

Os diferentes tipos de própolis brasileira têm sido considerados uma fonte rica de moléculas anti-inflamatórias devido a uma diversidade fitoquímica muito complexa (Franchin *et al.*, 2018). As própolis encontradas em diferentes continentes atuam através de diferentes mecanismos nos processos inflamatórios tais como: inibição da cicloxigenase, inibição da atividade das prostaglandinas (especialmente PGE2) e das citocinas pró-inflamatórias (por

exemplo, IL-6, IL-8), ação sobre a atividade de células inflamatórias (migração celular, ativação de macrófagos), redução na atividade de iNOS, redução da adesão de leucócitos e inibição da atuação do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Araújo *et al.* 2012; Takahashi *et al.*, 2015; Freires *et al.*, 2016).

Estudos farmacológicos atuais têm sido realizados para descobrir e desenvolver drogas anti-inflamatórias capazes de inibir não apenas a liberação e / ou produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, mas também proteínas envolvidas no rolamento e migração de leucócitos para o foco inflamatório e nesse sentido, avanços na pesquisa com a própolis brasileira são importantes para o desenvolvimento de potenciais novos medicamentos anti-inflamatórios (Franchin *et al.*, 2018). A literatura atual relata muitos estudos *in vitro* para a avaliação da atividade anti-inflamatória da PVB, principalmente com compostos isolados dessa própolis. Entretanto, são necessários mais estudos *in vivo* com o extrato, tal e qual consumido e utilizado tradicionalmente pela população, a fim de melhor entender o mecanismo de ação, biodisponibilidade, efeitos adversos e então refinar as dosagens e formulações para o desenvolvimento de terapias baseadas na PVB.

O extrato etanólico da própolis vermelha (EEP) e dois isolados desse tipo de própolis vestitol e neovestitol foram administrados por via subcutânea (dose de 10 mg / kg) em camundongos. Após indução de inflamação com carragenina, o EEP inibiu significativamente a migração de neutrófilos em níveis semelhantes aos da dexametasona (Bueno Silva *et al.*, 2013). Essa inibição também foi relada por Lima-Cavendish *et al.* (2015) que fizeram o pré-tratamento oral com o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (10 e 30 mg / kg) e seu biomarcador formononetina (10 mg / kg) e observaram a redução do edema induzido por carragenina. Batista *et al.* (2012) utilizaram uma pomada contendo 20% de extrato etanólico da própolis vermelha em feridas induzidas em ratos onde observaram redução dos efeitos inflamatórios e aumento da atividade cicatrizante.

A própolis vermelha *in vivo* promoveu efeitos protetores contra a colite ulcerativa em ratos, reduzindo lesões inflamatórias histológicas grosseiras e diminuindo os níveis de mieloperoxidase e iNOS no tecido do cólon (Bezzera *et al.*, 2017). Além disso, camundongos tratados oralmente com PVB mostraram cicatrização cutânea melhorada através do fechamento mais rápido da ferida, redução do infiltrado inflamatório e regulação negativa do fator de transcrição pNF- $\kappa$ B e das citocinas inflamatórias TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Corrêa *et al.*, 2017).

Compostos isolados presentes na própolis vermelha brasileira apresentaram atividade anti-inflamatória significativa e foi possível observar que estas moléculas desempenham um papel imunomodulador significativo através de diferentes mecanismos de ação. Em um estudo da atividade anti-inflamatória aguda e crônica com o neovestitol, Franchin *et al.*, 2016 observaram a redução da migração de neutrófilos, do rolamento e da adesão de leucócitos, bem como da expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), sugerindo que os efeitos modulatórios do neovestitol dependem da via do óxido nítrico e ocorrem parcialmente por redução da liberação de IL-6. Quanto à inflamação crônica, no mesmo estudo, o neovestitol também reduziu o escore clínico e o dano articular em um modelo de artrite induzida por colágeno.

Outro estudo investigou os efeitos anti-inflamatórios da biochanina A em células microgliais BV2 estimuladas com LPS. Os autores observaram redução na produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Estes achados sugerem que os efeitos inibitórios da biochanina A nas respostas pro-inflamatórias induzidas por LPS podem estar associados à inibição das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) em células microgliais BV2 (Wu *et al.*, 2015).

O vestitol reduziu a migração de neutrófilos *in vivo* induzida por diferentes estímulos inflamatórios, inibiu a liberação das quimiocinas CXCL1 / KC e CXCL2 / MIP-2 por macrófagos residentes *in vivo* e *in vitro* e, como resultado, diminui o rolamento e a adesão de leucócitos *in vivo*. Foi ainda determinado que o vestitol é capaz de diminuir a quimiotaxia de neutrófilos através do bloqueio do influxo de cálcio (Franchin *et al.*, 2016). A formononetina apresentou atividade anti-inflamatória e antioxidante ao promover efeitos protetores neurais em ratos, diminuindo os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e COX-2 (Li *et al.*, 2014). Em outro estudo inibiu a migração de leucócitos e com efeito antiedematogênico no ensaio de edema da pata (Lima-Cavendish *et al.*, 2015), além de bloquear a ativação do NF- $\kappa$ B (Wang *et al.*, 2012).

A quercetina a 20 mg / kg diminuiu o edema de pata induzido por carragenina e inflamação crônica em porquinhos-da-índia (Kaidama *et al.*, 2015), inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ) e suprimiu o estresse oxidativo induzido pela exposição à radiação em camundongos com secreção salivar danificada (Takahashi *et al.*, 2015). A isoliquirtigenina inibiu a expressão de ciclooxigenase (COX) e da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) e modulou as vias de sinalização do NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2008). A daidzeína é outra molécula bioativa que possui um significativo potencial anti-inflamatório. A administração dessa molécula reduziu significativamente o número de neutrófilos, a liberação de citocinas inflamatórias, o número de receptores TLR4 e a ativação do NF- $\kappa$ B após o desafio com LPS (Feng *et al.*, 2015).

#### 1.4.3 Atividade anticâncer

A própolis tem sido avaliada em diversos modelos experimentais quanto a sua ação anticâncer, com a identificação de um número elevado de compostos ativos nesses modelos (Awale *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2012). Os potenciais efeitos anticâncer, dos diferentes tipos de própolis, podem ser resumidos nos seguintes mecanismos possíveis: supressão da proliferação das células pré-cancerosas através do seu efeito imunomodulador, diminuição das populações de células-tronco cancerosas, bloqueio das vias de sinalização específicas, efeitos antiangiogênicos, modulação do microambiente tumoral e tratamento adjuvante ou complementar às terapias anticâncer convencionais (Chan *et al.*, 2012).

Apesar de existirem diversos estudos explorando as atividades biológicas da própolis, pouco se sabe das propriedades biológicas da própolis vermelha. A maioria dos estudos na literatura com a própolis vermelha baseia-se em ensaios *in vitro* de ação citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais. No entanto, os modelos *in vitro* podem não refletir as questões de metabolização e biodisponibilidade, bem como a ação de metabólitos químicos ativos após modificações enzimáticas no fígado (Freires *et al.*, 2016). Atualmente, têm sido relatados efeitos sobre o perfil de expressão de proteínas em linhagens celulares de câncer e efeitos moduladores da própolis sobre a carcinogênese *in vivo*. Os principais mecanismos antiproliferativos da própolis vermelha (e própolis em geral) e os seus compostos isolados incluem: indução da apoptose por meio de ativação da caspase-3, inibição da proliferação celular por meio das vias metabólicas e inibição de angiogênese (Chan *et al.*, 2012).

Com relação à atividade *in vitro* o extrato etanólico da própolis vermelha apresentou atividade citotóxica para as células do adenocarcinoma cervical humano (HeLa) (Alencar *et al.*, 2007, Frozza *et al.*, 2014), redução na viabilidade celular do câncer de mama humano (MCF-7) (Kamiya *et al.* (2012), células de leucemia mielóide crônica humana (K562), leucemia promielocítica aguda (HL60) e de melanoma murino (B16F10) (Novak *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2016), glioblastoma (SF-295), ovário (OVCAR-8) e cólon (HCT-116) (de Mendonça *et al.* 2015). Em linhagem celular tumoral PANC-1 (pâncreas humano) o extrato metanólico da própolis vermelha, na concentração de 10 µg/mL, produziu 100% de citotoxicidade, em meio com privação de nutrientes (Awale *et al.*, 2008). Frozza *et al.* (2017) avaliaram a fração enriquecida do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha brasileira contra carcinoma epidermóide da laringe humana (Hep-2). Os resultados da citometria de fluxo indicaram efeitos parcialmente mediados por morte celular programada, confirmada por externalização de fosfatidilserina, clivagem de DNA, aumento na fase Sub G1-G0 na análise do ciclo celular e perda do potencial de membrana mitocondrial.

Através de um experimento *in vivo*, Novak *et al.* (2014) demonstraram que a administração de 10 mg / kg / dia de uma fração ativa de PVB contendo xantocimiol e formononetina suprimiu ou retardou significativamente o crescimento (volume e peso) de xenoenxertos tumorais de melanoma B16F0 em camundongos C57BL/6. Ribeiro *et al.* (2015) investigaram o efeito da administração oral do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (50 e 100 mg / kg) em carcinomas de células escamosas orais em roedores. A própolis inibiu 40% do crescimento do carcinoma epidermóide oral induzido por 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) e promoveu um atraso de três semanas no desenvolvimento de tumores clinicamente detectáveis em modelos murinos. Pinheiro *et al.* (2014) avaliaram os efeitos modulatórios de um extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (10, 50 e 100 mg / kg) na carcinogênese dérmica utilizando camundongo. A maior dose apresentou efeito modulatório significativo na formação, diferenciação e progressão do carcinoma epidermóide quimicamente induzido.

Em resumo, devido a uma composição química distinta e complexa, a PVB exibe um amplo espectro de propriedades biológicas que podem ter um impacto contra inúmeras doenças por apresentar ações anti-inflamatórias, antioxidante, antibacteriana, anticâncer e imunomodulatória. Sua biodisponibilidade por via oral e bom perfil de segurança, pelo histórico de uso, torna a própolis um agente adjuvante ideal para um imunomodulador futuro e/ou um tratamento complementar nas terapias anticâncer convencionais.

#### **1.5 CÂNCER DE PRÓSTATA**

A próstata é uma glândula sexual masculina acessória encontrada apenas em mamíferos, que produz componentes importantes do fluido seminal (Marker *et al.*, 2003). A morfogênese, função, morfologia, proliferação e a diferenciação das células da próstata são reguladas por andrógenos (Leav *et al.*, 2001). O receptor de androgênio (AR) é um receptor de hormônio nuclear cuja sinalização desempenha papel fundamental tanto no desenvolvimento normal da próstata quanto no câncer de próstata (Cunha *et al.*, 2002). O androgênio mais abundante é a testosterona, sintetizada pelos testículos e convertida no metabólito ativo a diidrotestosterona, no tecido da próstata através da atividade da 5a-redutase. Além disso, a glândula adrenal sintetiza espécies androgênicas menores, incluindo androstenediona e dehidroepiandrosterona (DHEA), que podem ser convertidas em testosterona (Toorians *et al.*, 2003).

McNeal (1988) definiu a próstata humana como tendo uma arquitetura zonal com três grandes regiões glandulares - a zona periférica, a zona central e a zona de transição - que

diferem histologicamente e biologicamente além de possuírem características arquitetônicas e estromais específicas. Em todas as zonas, os dois ductos e os ácinos são revestidos por epitélio secretor. Em cada zona, há uma camada de células basais abaixo do revestimento secretor, bem como células endócrino-parácrinas intercaladas.

Ao contrário da próstata humana, a próstata de roedores apresenta aspecto multilobulado, disposta em torno da uretra na base da bexiga, com padrões distintos de ramificação ductal, aparência histológica e expressão gênica (Cunha *et al.*, 1987). O processo de morfogênese em roedores dá origem a três lóbulos prostáticos distintos bilateralmente simétricos: ventral, dorsolateral e anterior (também conhecido como glândula coagulante) (Marker *et al.*, 2003).

Observações comparativas diretas entre os lóbulos da próstata do rato e as zonas específicas da próstata humana demonstram oposições entre patologistas (Shen & Abate-Shen, 2010). Embora lóbulos distintos possam ser reconhecidos na próstata humana em desenvolvimento, a próstata humana adulta não é dividida em estruturas lobulares discretas. Portanto, existem diferenças claras e fundamentais na organização anatômica da próstata entre o humano e o roedor (Shappell *et al.* 2004). No entanto, análises de dados de perfis de expressão gênica sustentam a ideia de que o lobo dorsolateral é mais semelhante à zona periférica da próstata humana (Berquin *et al.* 2005).

Histologicamente, tanto a próstata de roedores quanto de humanos possuem um epitélio pseudoestratificado com três tipos diferenciados de células epiteliais: luminal, basal e neuroendócrina e contêm o estroma fibromuscular (Shappell *et al.* 2004; Shen & Abate-Shen, 2010). O epitélio é organizado em ácinos glandulares que secretam para o espaço interluminal. Um estroma fibromuscular está situado no lado oposto da lâmina basal (Barron & Rowley, 2012). Após a organogênese, as células epiteliais mantêm uma relação homeostática com os componentes mesenquimais (Bianchi-Frias *et al.*, 2016). Esse estroma é um arranjo complexo de componentes estromais, que incluem proteínas estruturais e tipos celulares, como endotélio, células nervosas, músculo liso, fibroblastos e matriz extracelular, associado a fatores de crescimento, moléculas reguladoras, enzimas de remodelação, vasos sanguíneos, nervos e células imunes (Tuxhorn *et al.*, 2001; Bianchi-Frias *et al.*, 2016).

O compartimento estromal normal responde rapidamente a situações emergentes, como no reparo de feridas e na homeostase interrompida, pois além de simplesmente fornecer uma arquitetura estática, os elementos estromais formam interações dinâmicas e recíprocas com o epitélio (Bianchi-Frias *et al.*, 2016). As alterações fenotípicas e genotípicas que ocorrem durante essa resposta a danos foram coletivamente denominadas de estroma reativo e

esse evento inclui remodelação de matriz e expressão alterada de fatores de crescimento associados a reparo e citocinas (Barron & Rowley, 2012).

As respostas estromais a danos e a ocorrência do chamado estroma reativo dá origem a um novo microambiente estromal que pode ser útil como indicador prognóstico da progressão e recorrência do carcinoma prostático. O aumento de células inflamatórias, angiogênese, fatores de crescimento e remodelação da matriz extracelular aponta o ambiente de estroma reativo como componente biológico importante do câncer (Tuxhorn *et al.*, 2001; Tomas *et al.*, 2010). A neoplasia intraepitelial prostática (NIP) é considerada uma lesão precursora do adenocarcinoma invasivo que, por uma combinação de eventos celulares inicia uma cascata de instabilidade genômica, mudanças fenotípicas das células estromais, remodelação da matriz extracelular (MEC) e indução da angiogênese (Bettendorf *et al.* 2008).

O câncer de próstata é considerado como o mais comum câncer não-cutâneo diagnosticado em homens, representando quase 1 em cada 5 novos diagnósticos (Siegel *et al.*, 2018). Os fatores de risco estabelecidos para esta doença incluem idade, etnia, dieta, histórico familiar e condições genéticas (Wang *et al.*, 2018). Para o Brasil, estimam-se 68.220 casos novos de câncer de próstata para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA 2018). Nos EUA a estimativa de novos casos é de 164.690 e a estimativa de morte é de 69.430 em 2018 (Wang *et al.*, 2018). Embora novos casos de câncer de próstata sejam rapidamente detectáveis, esses cânceres muitas vezes se tornam independentes de andrógenos e adquirem resistência a esses hormônios, marcando sua progressão letal, já que são mais agressivos, metastáticos (especialmente para o osso) e resistentes a quimioterápicos (Siegel *et al.*, 2018).

Atualmente existem diferentes modelos animais para utilização no estudo do câncer de próstata. O camundongo transgênico para o adenocarcinoma de próstata (TRAMP, do inglês: *transgenic adenocarcinoma of mouse prostate*) tem sido amplamente utilizado, uma vez que as próstatas desses camundongos progridem através de diferentes lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, semelhantes ao que ocorre no homem, representando um modelo importante para investigações desse tipo de câncer (Gingrich & Greenberg. 1996; Chiaverotti *et al.*, 2008). No carcinoma prostático espontâneo do TRAMP há a expressão da oncoproteína viral (Tag) SV40 nas células luminais prostáticas. O elemento andrógeno-regulado e próstata-específico probasina regula a expressão dessa oncoproteína, e a inativação da (Tag) SV40 bloqueia a atividade de importantes genes supressores de tumor fazendo com que o camundongo TRAMP apresente neoplasia restrita à próstata. (Greenberg *et al.*, 1995). O lobo ventral é comumente utilizado em estudos com esse modelo animal por apresentar alteração na

expressão de 36 proteínas durante a carcinogênese (Zhang *et al.*, 2011). Isso ocorre, pois a transgene é expressa em níveis mais elevados nesse lobo (Greenberg *et al.*, 1995).

Entre 6 e 12 semanas de idade dos animais, as células epiteliais da próstata desenvolvem vários graus de hiperplasia ou neoplasia intraepitelial prostática (NIP). Com aproximadamente 18 semanas de idade, os camundongos desenvolvem adenocarcinomas prostáticos bem diferenciados. Entre as idades de 24 e 30 semanas, quase 100% dos camundongos TRAMP terão carcinomas pouco diferenciados, com possíveis metástases e sobrevida de 50 - 54 semanas de idade (Greenberg *et al.*, 1995; Berman-Booty at al., 2011). Está bem estabelecido que esse modelo oferece muitas vantagens para o estudo de agentes quimioterápicos, incluindo seu curso bem definido de progressão da doença e alta incidência de carcinomas pouco diferenciados em um período relativamente curto de tempo (Berman-Booty *et al.*, 2011).

Em um estudo *in vitro*, Li *et al.* (2007) mostraram que os extratos etanólicos de dois tipos diferentes de própolis brasileira (própolis verde e grupo 3) apresentam efeito inibitório significativo sobre a proliferação de células humanas de câncer de próstata (DU145 e PC-3) e tumor maligno primário de próstata (RC58T / h / SA # 4). A própolis verde induziu parada na fase S do ciclo celular e a própolis do grupo 3 parada em G2. A inibição da proliferação celular ocorreu através da regulação da expressão proteica de ciclina D1, B1 e quinase dependente de ciclina (CDK) bem como p21.

O extrato etanólico da própolis verde e seus componentes bioativos em combinação com TRAIL, um ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral, teve seus efeitos citotóxicos e apoptóticos demonstrados em células de câncer de próstata dependente de hormônio (LNCaP). O extrato foi capaz de ajudar as células a superarem a resistência do TRAIL ao envolver as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca e regular a atividade do NF-κB (Szliszka *et al.*, 2011). Essa ação pode estar relacionada ao composto Artepenina C, presente na própolis verde, que também aumentou a expressão de TRAIL em células LNCaP e diminuiu a atividade do NF-κB. Além disso, induziu uma ativação significativa de caspase-8 e caspase-3, sensibilizando as células cancerígenas por vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas (Szliszka *et al.*, 2012).

Os componentes fenólicos contribuem para as principais propriedades preventivas e antitumorais da própolis. O éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) é um dos principais componentes fenólicos biologicamente ativos extraídos da própolis. O CAPE suprimiu o crescimento celular de células LNCaP, DU-145 e PC-3 *in vitro* e *in vivo* suprimindo as redes de sinalização de proteínas relacionadas ao oncogene viral c-Myc e proteínas quinase B (Akt)

(Chuu *et al.* 2012, Lin *et al* 2012), preveniu o dano induzido pela quimioterapia e os efeitos colaterais em animais experimentais (Lin *et al.*, 2013). São poucos os estudos na literatura que utilizam extratos de própolis no estudo de câncer de próstata. Dos poucos que existem, as informações são referentes a atividades *in vitro* principalmente da própolis verde e de compostos isolados de outras própolis. Esse é o primeiro estudo que visa relacionar o uso de própolis vermelha *in vitro* e *in vivo* no câncer de próstata.

#### **2. JUSTIFICATIVA**

As atuais estratégias da terapia anticâncer, como a radioterapia, terapia-alvo, a imunoterapia e quimioterapia permanecem paliativas ou insatisfatórias devido ao aparecimento de metástase ou de reincidência após a cirurgia / terapia, resistência a medicamentos e efeitos secundários adversos. O microambiente tumoral oferece múltiplos alvos para terapia anticâncer, incluindo a inflamação. Assim, o co-tratamento com medicamentos que modificam o ambiente tumoral pode promover uma resposta adjuvante na quimioterapia agindo em alvos específicos. O câncer de próstata tem sido amplamente estudado, pois afeta um grande número de indivíduos, porém ainda não são conhecidas estratégias terapêuticas totalmente seguras e eficazes devido à complexidade de seu desenvolvimento e sua importante interação epitélio-estroma (célula tumoral–ambiente tumoral).

Estudos sugerem que diversos produtos naturais agem direta ou indiretamente em múltiplas vias de sinalização de células cancerosas. Considerando-se todas as informações aqui apresentadas, é fácil imaginar o potencial importante da própolis vermelha brasileira para a saúde da população e mercado brasileiro e internacional, especialmente por conta de suas propriedades biológicas e sua composição química distinta que pode dar origem a novos medicamentos. A PVB e seus compostos isolados (principalmente isoflavonas) afetam uma ampla gama de alvos biológicos e podem ter um impacto contra inúmeras doenças atuando como agente antimicrobiano, anti-inflamatório, imunomodulador, antioxidante e antiproliferativo. A maioria dos estudos encontrados na literatura atual avalia a atividade da PVB apenas *in vitro* e nesse sentido, é importante considerar o investimento em ensaios *in* vivo com o objetivo de explorar os benefícios observados com o uso tradicional, a fim de refinar as dosagens e conhecer seus efeitos terapêuticos e adversos. A própolis vermelha brasileira é um produto único que deve ser explorado, pois apresenta boa biodisponibilidade por via oral, bom perfil de segurança e atua na modulação do microambiente tumoral. Portanto, a combinação de fármacos anticâncer e extratos ou compostos derivados de própolis vermelha podem oferecer uma vantagem significativa e eficaz na sensibilização da monoterapia e superar a resistência induzida por fármacos em pacientes com câncer.

#### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar as atividades anticâncer e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de extratos e frações obtidos da própolis vermelha brasileira

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a atividade antitumoral do extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) em animais com tumor sólido de Ehrlich;
- Analisar o efeito anti-inflamatório do EEPV sob o edema de pata induzido por diferentes compostos que atuam em vias do processo inflamatório e sob o edema de orelha induzido por óleo de cróton;
- Investigar a ação do EEPV em células tumorais prostática e na próstata de camundongos transgênicos para o adenocarcinoma (TRAMP);
- Avaliar os mecanismos moleculares de morte celular do EEPV in vitro e in vivo;
- Biomonitorar o EEPV, frações e composto isolado através de teste de atividade antiproliferativa em células tumorais e não tumorais humanas *in vitro*;
- Identificar os compostos presentes na fração biomonitorada.

# Atividades antitumoral e anti-inflamatória *in vivo* do extrato etanólico da própolis vermelha

#### **Considerações sobre o Capítulo 1**

O capítulo 1 trata do estudo "Atividades antitumoral e anti-inflamatória in vivo do extrato etanólico da própolis vermelha" ou "In vivo antitumor and anti-inflammatory activies of Brazilian Red propolis", submetido para publicação no Journal of Ethnopharmacology. Essa parte do estudo teve como objetivo avaliar os efeitos antitumorais do extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) in vitro e in vivo, juntamente com sua atividade anti-inflamatória, utilizando modelos de inflamação induzida por diferentes mediadores em camundongos. A EEPV foi avaliada quanto à sua atividade antiproliferativa in vitro em dez linhagens celulares de câncer humano e em uma linhagem celular não tumoral onde promoveu inibição do crescimento e citotoxicidade de maneira concentração-dependente, sem seletividade para um tipo tumoral específico. Para a seleção de doses seguras a serem usadas nos testes in vivo foi realizado o teste de toxicidade aguda, que não apresentou nenhuma evidência de toxicidade em animais tratados com a dose máxima de 1000 mg/kg por via oral. A atividade antitumoral in vivo foi avaliada utilizando o modelo de tumor sólido de Ehrlich em camundongos Balb / C machos adultos (n = 6), tratados por via oral com EEPV (50, 100 e 200 mg / kg), em dias intercalados. O EEPV foi capaz de diminuir o crescimento tumoral em todas as doses testadas. A atividade anti-inflamatória foi avaliada através do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton e do edema de pata induzido por carragenina (3%) e diferentes agentes (composto 48/80, bradicinina, prostaglandina E<sub>2</sub>) em camundongos Balb / C machos. A ativação de neutrófilos foi avaliada através da atividade da enzima mieloperoxidase no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Para os experimentos de avaliação da atividade anti-inflamatória, os animais foram pré-tratados por via oral com as doses de 50, 100 e 200 mg / kg de EEPV (edema de pata induzido por carragenina), por via tópica com as mesmas doses (edema de orelha induzido por óleo de cróton) e por via oral com a dose de 200 mg / kg (demais edemas de pata). O EEPV apresentou atividade dose-dependente no edema de pata induzido por carragenina, sendo que a maior dose (200 mg / kg) inibiu a formação de edema desde as primeiras horas até o final do experimento. Tal efeito sobre as etapas iniciais do processo inflamatório sugere uma ação sobre mediadores vasoativos, tais como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas. De fato, o pré-tratamento com EEPV (200 mg / kg) inibiu significativamente a formação de edema de pata induzido pelos compostos 48/80 (controlado por histamina e serotonina), bradicinina e PGE<sub>2</sub>. O tratamento tópico com o EEPV também inibiu a formação de edema de orelha, e a atividade anti-inflamatória foi evidenciada pela inibição da ativação de neutrófilos. Sendo assim, as atividades anti-tumorais e anti-inflamatórias combinadas sugerem que o EEPV atua através de múltiplas características do câncer, afetando diretamente a proliferação de células tumorais e o ambiente do tumor, possivelmente modulando a tumorigênese e a inflamação associada ao tumor. Estes resultados indicam o EEPV como agente a ser explorado para potencial uso em terapias combinatórias para a modulação de processos inflamatórios agudos ou crônicos e potencialmente na prevenção de câncer.

#### In vivo antitumor and anti-inflammatory activities of Brazilian Red Propolis

Thais Petrochelli Banzato<sup>1,2</sup>, Fabiana Regina Nonato<sup>2</sup>, Fernanda Francetto Juliano<sup>3</sup>, Severino Matias de Alencar<sup>3</sup>, Paula Araújo Monteiro<sup>1,2</sup>, Rafael Rosolen Teixeira Zafred<sup>2</sup>, Sirlene Valério Tinti<sup>2</sup>, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz<sup>2,4</sup>, Débora Barbosa Vendramini-Costa<sup>5,\*,#</sup>, João Ernesto de Carvalho<sup>2,4,#</sup>.

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, Structural and Cellular Biology Postgraduate Program, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center, CPQBA, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Department of Agri-food Industry, Food and Nutrition, 'Luiz de Queiroz' College of Agriculture, University of São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup> Cancer Biology Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

\* **Corresponding author:** Fox Chase Cancer Center, 999 Cottman Ave, Room W428, Philadelphia, PA 19111, USA. E-mail address: vendramini.debora@gmail.com

E-mail may also be addressed to Thais Petrochelli Banzato (thaisbanzato@gmail.com). **# co-last authors.** 

#### ABSTRACT

**ETHNOBOTANICAL RELEVANCE:** Propolis, a natural resinous product collected by honeybees from the buds and exudates of various plant sources, has been used empirically as a traditional remedy in folk medicine for centuries. Among Brazilian propolis varieties, Brazilian red propolis (BRP), collected at Alagoas State, Northeast of Brazil, presented a unique chemical composition enriched in isoflavonoids and its biological properties still need to be explored. Studies report potential *in vitro* anti-inflammatory and antitumor activity for the ethanolic extract of Brazilian red propolis (EERP), but there are few studies evaluating its effects in *in vivo* systems.

#### AIM OF THE STUDY

To evaluate the antitumor effects of EERP *in vitro* and *in vivo*, together with its antiinflammatory activity, using murine models of inflammation induced by different mediators.

**MATERIALS AND METHODS:** EERP was evaluated for its *in vitro* antiproliferative activity in ten human cancer cell lines and one non-tumoral human cell line. The *in vivo* antitumor activity was evaluated using the Ehrlich solid tumor model in male Balb/C mice (n = 6), treated orally with EERP (50, 100 and 200 mg/kg). The anti-inflammatory activity was assessed by the croton oil-induced ear edema and paw edema induced by carrageenan (3%) and different agents (compound 48/80, bradykinin, prostaglandin E<sub>2</sub>) in male Balb/C mice. Neutrophil activation was assessed through myeloperoxidase activity in the croton oil-induced ear edema model.

**RESULTS:** EERP promoted growth inhibition and cytotoxicity in a concentration-dependent way without tumor type selectivity. Treatments *in vivo* with the three doses of EERP (50, 100 and 200 mg/kg) were able to decrease tumor growth. In the inflammation models, EERP showed dose-dependent activity in the carrageenan-induced paw edema, with the highest dose (200 mg/kg) inhibiting the formation of edema from the first hours until the end of the experiment. Pre-treatment with EERP (200 mg/kg) significantly inhibited paw edema formation induced by compound 48/80, bradykinin and PGE<sub>2</sub> and the inhibition of neutrophil activation was confirmed using the croton oil-induced ear edema in mice.

**CONCLUSIONS:** The combined antitumoral and anti-inflammatory activities suggest that EERP targets multiple hallmarks of cancer, directly affecting tumor cell proliferation and the tumor environment, possibly modulating tumorigenesis and tumor-associated inflammation. These results indicate EERP as an agent to be explored for potential use in combinatory therapies for the modulation of acute or chronic inflammatory processes and potentially in the prevention of cancer.

KEYWORDS: Propolis, Brazilian red propolis, Cancer, Inflammation, Paw edema.

#### **ABBREVIATIONS:**

BRP: Brazilian red propolis, EERP: ethanolic extract of Brazilian red propolis, DMSO: dimethyl sulfoxide, TGI: total growth inhibition, Dexa: dexamethasone, PBS: phosphate-buffered saline, PGE<sub>2</sub>: prostaglandin E<sub>2</sub>, BK: Bradykinin, MPO: myeloperoxidase, HTAB: hexadecyltrimethylammonium bromide buffer, DOX: Doxorubicin, HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

#### **Grafical Abstract**


# **1. INTRODUCTION**

Propolis is a complex resinous substance collected mainly by *Apis mellifera* honeybees, from leaf buds, tree barks, and exudates of plant sources (Franchin et al., 2017). Due to its resinous nature and mechanical properties, bees use propolis in the beehive to repel and embalm parasites, kill microorganisms, seal holes in the hive and to smooth out the internal walls. Moreover, propolis is used to protect the entrance against intruders, humidity and wind and for thermal insulation (Bufalo et al., 2013; Freires et al., 2016). The chemical composition of propolis depends on the harvest period, local biodiversity, and the beehive's phytogeographic position in the region from where it is collected (Bueno-Silva et al., 2016).

Propolis has been used empirically as a traditional remedy in folk medicine for centuries (~300 BC). Old Egyptians, Greeks and Romans used propolis to embalm corpses and to treat wounds, cutaneous lesions and ulcers; the Incas used propolis as an antipyretic (Castaldo and Capasso, 2002). Propolis was included in the London Pharmacopoeia as an official drug in the seventeenth century and importantly, it was used as an antimicrobial and anti-inflammatory agent during the Second World War (Berretta et al., 2017; Castaldo and Capasso, 2002). Currently, there are many reports correlating numerous biological properties with variations in its chemical composition (Freires et al., 2016; Silva et al., 2008). Among the reported biological activities of propolis are antioxidant (Fonseca et al., 2011; Lopes et al., 2013), anti-herpes (Shimizu et al., 2011), antibacterial (Fernandes, F.H. et al., 2015), antiviral (Takemura et al., 2012), antifungal (de Castro et al., 2011), antiulcer (Barros et al., 2008), immunomodulatory (Machado et al., 2012; Orsolic and Basic, 2003), anti-inflammatory (Franchin et al., 2016) and antiproliferative (Sforcin and Bankova, 2011).

Brazilian propolis is quite diverse in its chemical composition due to Brazil's rich biodiversity; it is currently classified into 13 different types according to physical-chemical properties and geographical location (Park et al., 2002; Silva et al., 2008). Brazilian red propolis (BRP), collected at Alagoas State, Northeast of Brazil, is the most recently discovered type, and presents a unique chemical composition enriched in isoflavonoids (Berretta et al., 2017; Nani et al., 2018). In fact, BRP from Alagoas has been internationally certified by the Brazilian National Institute of Industrial Property as a unique product (Berretta et al., 2017; Freires et al., 2016). Other compounds identified in BRP include isoflavones, pterocarps, chalcones, flavonoids, benzenphenones, terpenes and tannins. The chemical markers of this propolis are isoflavonoids, including formononetin, biochanin A, pinocembrin and medicarpin (Freires et al., 2016). Due to the variety of chemical compounds

present in this type of propolis, several biological properties were described, such as antibacterial (Bueno-Silva, B. et al., 2017), antioxidant (Alencar et al., 2007; Righi et al., 2011), anti-inflammatory (Barbosa Bezerra et al., 2017; Bueno-Silva, Bruno et al., 2017) and antiproliferative (de Mendonça et al., 2015; Ribeiro et al., 2015).

Natural products constitute a major source of effective drugs for the treatment of several diseases, including cancer, and often inspire the development of new potential agents (Newman and Cragg, 2016). Although there have been substantial advances in cancer prevention and therapy, the statistics of cancer incidence and mortality are still quite staggering. Cancer is the second leading cause of death worldwide, with 8.8 million deaths in 2015 (1 in 6 deaths is due to cancer) (Ferlay et al., 2015). Therefore, there is an intense and necessary effort to search for therapeutic alternatives for cancer. One of the hallmarks of the tumor microenvironment is inflammation and this process is known to promote cancer development, either during early or advanced stages (Grivennikov et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011). In this sense, inflammation is an important target in the tumor microenvironment and drugs modulating this process are attractive adjuvants for cancer prevention and therapy, as seen with the correlation between the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and the decreased risk for different types of cancer (Cuzick et al., 2009; Ulrich et al., 2006).

Propolis has been popularly used as an anti-inflammatory in different contexts. In the case of BRP, there are studies reporting its anti-inflammatory activities, although most of them were conducted in *in vitro* systems or address the effects of its secondary metabolites, mainly flavonoids (Bueno-Silva et al., 2013; Bueno-Silva et al., 2015; Franchin et al., 2016). In this context, the potential anti-inflammatory effects of BRP could be beneficial for cancer prevention and control, but surprisingly, although widely used for different diseases, the antitumor properties of BRP were mainly investigated through the cytotoxic action against different tumor cell lines, with few studies using *in vivo* systems or correlating the anti-inflammatory and antitumor activities.

Having in mind the need for new therapies for cancer prevention and control, the potential anti-inflammatory activity of BRP and the lack of studies evaluating its antitumor effects in *in vivo* systems, herein we evaluate the antiproliferative effects of BRP *in vitro* and *in vivo*, together with murine models of inflammation induced by different mediators. Importantly, in this study we used the ethanolic extract, which is the popular form of consumption of BRP.

## 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. BRP collection and preparation of the ethanolic extract

Brazilian red propolis samples were collected from boxes of *Apis mellifera*, located in Maceió, Alagoas State, northeast of Brazil (9°40′ S, 35°41′ W), at the end of summer. Identification and chemical characterization were performed in the Department of Agri-food Industry, Food and Nutrition, "Luiz de Queiroz" College of Agriculture, University of São Paulo (Piracicaba, São Paulo, Brazil) by Dr. Severino Matias de Alencar. Propolis was grounded to a fine powder and 20 g (dry weight) was mixed with 250 mL of 80% (v/v) ethanol and shaken at 70°C for 30 min. After extraction, the mixture was centrifuged, and the supernatant was evaporated under low pressure to produce the ethanolic extract of Brazilian red propolis (EERP) (Silva et al., 2008).

#### 2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The chemical composition of EERP was evaluated by HPLC according to Silva et al. (2008), in order to confirm the quality of the extract by comparing with the chemical profile obtained for BRP, already described in the literature (Bueno-Silva et al., 2015; Bueno-Silva, Bruno et al., 2017). The analysis was performed using a Reversed Phase HPLC system equipped with a Shimadzu ODS-A column (RP-18, column size  $4.6 \times 250$  mm; particle size  $5 \mu$ m) and a photodiode array detector (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). The extract was filtered (0.22 µm diameter - Millipore) and 20 µL was injected in the HPLC system. The column was eluted using a linear gradient of water/acetic acid (99.5/0.5 v/v) (solvent A) and methanol (100%) (solvent B), starting with 30% B and increasing to 40% B (15 min), 50% B (30 min), 60% B (45 min), 75% B (65 min), 75% B (85 min), 90% B (95 min), and decreasing to 30% B (105 min), at a solvent flow rate of 1.0 mL/min. Chromatograms were recorded at 260 nm and the following authentic standards of phenolic acids and flavonoids (Extrasynthese Co and Sigma–Aldrich) were examined: formononetin, daidzein, biochanin A, catechin, epicatechin, ferulic acid, quercetin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, neovestitol and vestitol ( $\geq 60\%$ , isolated by HPLC semi-preparative).

# 2.3. In vitro antiproliferative assay

#### 2.3.1. Cell lines and culture

The antiproliferative activity of EERP was evaluated *in vitro* against ten different human cancer cell lines [U251 (glioma), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (multidrug resistant ovary carcinoma), OVCAR-3 (ovary), 786-0 (renal), NCI-H460

(nonsmall cell lung cancer), PC-3 (prostate), HT-29 (colon) and K-562 (leukemia)], kindly provided by the National Cancer Institute, Frederick, MD, USA. The non-tumoral cell line HaCat was also used (spontaneously transformed keratinocytes from histologically normal skin) provided by Dr. Ricardo Della Coletta (University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil). Stock cultures were maintained in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

# 2.3.2. Antiproliferative assay

For the experiments, cell suspensions at different densities were plated in 96-well plates (100  $\mu$ L suspension/well) and exposed to EERP (0.25, 2.5, 25 and 250  $\mu$ g/mL in DMSO/RPMI) at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub> for 48 h. Final DMSO concentration (0.25%) did not affect cell viability. Doxorubicin (Europharma) was used as standard (0.025, 0.25, 2.5 and 25  $\mu$ g/mL). Before (T0, time zero plates) and 48 h after (T1 plates) sample addition, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid (Sigma) and cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular protein content using the sulforhodamine B assay (Monks et al., 1991). If the readings from T1 plates were higher than in the T0 plates, it is indicative of cellular proliferation. If the readings were smaller, it means that the treatments promoted a cytotoxic effect, culminating in cell death. Lastly, if the readings from plates T0 and T1 are equal, the samples were cytostatic. The TGI (concentration that produces total growth inhibition or cytostatic effect) (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006) was determined through non-linear regression analysis using the concentration response curve for each cell line in ORIGIN 8.0® (OriginLab Corporation), and the results are expressed as the mean ± standard error of mean (SEM) from four different experiments in triplicate.

#### 2.4. In vivo assays

#### 2.4.1. Animals

Experiments were conducted with Swiss and Balb/C adult mice (20 - 35 g), female and male respectively, obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animals Sciences (CEMIB – University of Campinas). Animals were maintained at the Animal facilities of the Pharmacology and Toxicology Division, CPQBA, University of Campinas (Campinas, Brazil), under controlled temperature  $(22^\circ \pm 3^\circ \text{C})$ , in a 12 h light/dark cycle and with free access to food and water. Mice were fasted for 8 h prior to each

experiment when treatments were administered orally, but with access to water *ad libtum*. At the end of the experiments, animals were euthanized (overdose of anesthesia followed by cervical dislocation). Animal care, research and animal sacrifice protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethical Committee for Animal Research of University of Campinas (numbers 3992-1, 3922-1 and 4179-1).

# 2.4.2. Drugs

EERP (50, 100, 200 and 1000 mg/kg) was emulsified with 1% Tween 80 (Sigma) and dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.0. Vehicle was 1% Tween 80 in PBS, 10 mL/kg, for all experiments. The standard drugs, Doxorubicin (Europharma), Dexamethasone (Dexa, Sigma), Cyproheptadine (Periactin) and Piroxicam (Pfizer) were used as positive control and dissolved in PBS + 1% Tween 80 (Sigma).  $\lambda$ -carrageenan, Compound 48/80 (C48/80), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and Bradykinin (BK) from Sigma were dissolved in PBS.

# 2.4.3. Acute toxicity

The acute toxicity test was conducted to determine the toxic, lethal and therapeutic doses of EERP. This test was based on the OECD 425/2008 - OECD guidelines for the testing of chemicals Acute Oral Toxicity - Up-and-Down- Procedure (UDP), with modifications. Swiss female mice (n = 5) were treated orally with EERP (1000 mg/kg). Animals were observed for 4 h and then daily for 14 days. The following parameters were evaluated: general toxicity signals like body weight loss, behavior (agitation, lethargy), respiration, salivation, tearing eyes, cyanosis and mortality (OECD, 2008).

# 2.4.4. Ehrlich solid tumor

*Cell maintenance and preparation*: Ehrlich tumor cells were maintained in the ascitic form in the peritoneum of Swiss female mice by weekly transplantation of  $5 \times 10^5$  tumor cells.

*Ehrlich Solid Tumor*: this model was conducted to investigate the systemic activity of EERP. In this assay four groups (n = 6, Balb/C male mice) received  $10^5$  cells in 0.1 mL PBS, subcutaneously, in the back. Treatments started when the tumors were palpable, approximately 5 days after inoculation. Animals were treated orally with EERP (50, 100 and 200 mg/kg) and negative control (vehicle) every other day; the positive control (Doxorubicin, 5 mg/kg) was administered i.p. every three days. After 9 days of treatment all animals were

euthanized and tumors were excised and weighed, providing the relative tumor weight (tumor weight divided by corporal weight) (de Oliveira et al., 2016).

# 2.4.5. Carrageenan-induced paw edema

Experiments were conducted according to Vendramini-Costa et al. (2015) and de Oliveira et al. (2016). Balb/C male mice (n = 6/group) were treated orally as follows: EERP (50, 100 and 200 mg/kg), negative control (vehicle) and positive control (piroxicam, 40 mg/kg). After 60 min, inflammation was induced by inoculation of 30  $\mu$ L of 3% (w/v) carrageenan into the right hind footpad and the edema was determined by the difference between the measured volume at each time point (1, 2, 4, 6, 24, 48 and 72 h after carrageenan inoculation) and the basal volume. The volume of edema in milliliters was registered using a plethysmometer apparatus (7140 Ugo Basile, Italy), where the right hind paw was submerged until the tibiotarsal joint in the measuring chamber of the device. The volume of fluid displaced was recorded and translated as the volume of the paw. The results were expressed as percentage of edema, which is the difference between the volume of the paw at the referred time intervals and the basal volume. The percentage of inhibition was calculated as follows: [(A – B) / A] × 100, where A = edema volume of negative control group and B = edema volume of experimental group.

# 2.4.6. Paw edema induced by compound 48/80, Bradykinin and PGE<sub>2</sub>

Balb/C male mice were divided into three groups (n = 8) and treated orally with EERP (200 mg/kg), negative control (vehicle) and positive control. After 30 min, inflammation was induced by the intraplantar injection (right hind paw) of the inflammatory compounds and the edema was measured before and 15, 30, 60, 90 and 120 min after inflammation induction, using the plethysmometer apparatus (7140 Ugo Basile, Italy). Inflammatory inducers and respective positive controls were as follows: compound 48/80 (Sigma) (30 µg/paw, positive control Ciproheptadine, 4 mg/kg, i.p.), Bradykinin (30 µg/paw, positive control Dexa, 5 mg/kg, i.p.) and PGE<sub>2</sub> (1 µg/paw, positive control piroxicam, 20 mg/kg, i.p.) (Vendramini-Costa et al., 2015). The percentage of paw edema was measured and the percentage of inhibition was calculated as described in the section 2.3.5.

# 2.4.7. Croton oil-induced ear edema

To estimate the topical anti-inflammatory activity of EERP, the Croton oil-induced ear edema test was performed as reported by Schinella et al. (2014). Balb/C male mice were divided into

three groups (n = 7) and treated topically with EERP (200 mg/mL dissolved in acetone 70%), negative control (acetone 70%) and positive control (Dexa, 5 mg/mL). One hour after treatments, mice received a topical application of croton oil (20  $\mu$ L/ear of 5% (v/v) croton oil dissolved in acetone 70% in the right ear while the left ear was treated with 70% acetone (20  $\mu$ L/ear). Four hours after croton oil application, the animals were euthanized and a plug (6 mm diameter) was removed from the right ears. The ear edema was determined by weight difference between the left and right ears. Ear samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at – 80 °C until use in the myeloperoxidase (MPO) assay.

# 2.4.8. Determination of Tissue Myeloperoxidase Activity – assessment of neutrophil activation

MPO activity was assessed as an index of neutrophil infiltration and activation, according to the method of Bradley et al. (1982), with modifications. For quantification of MPO activity, ear fragments (100 mg) were mixed with 1 mL of reaction buffer (50 mM potassium phosphate buffer pH 6.0 with 0.5% HTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide buffer). Samples were homogenized in IKA grinder (Disperser T 10 basic, Staufen, Germany) and then centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C. In a 96-well plate, 10 µL of the sample supernatant and 290 µL of substrate buffer (0.167 mg/mL ortho-dianisin and 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in phosphate buffer) were added, in triplicate. For the blank, 290 µL of the substrate buffer was used. The plate was incubated at 37°C for 5 minutes. To stop the reaction, 50 µL of 4M sulfuric acid was used. The reading was performed at 450 nm in a spectrophotometer.

#### 2.5. Statistical analysis

The experimental results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The statistical significance of the difference between the groups was assessed by analysis of variance ANOVA, one-way and two-way, followed by Tukey or Bonferroni tests, respectively. P values lower than 0.05 (p < 0.05) were considered as indicative of significance and represented by: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001. The calculations were performed using the statistical software Graph Pad Prism version 5.0, San Diego California, USA.

#### **3. RESULTS**

# 3.1 EERP chemical analysis

The chemical characterization of EERP by HPLC was performed in order to ensure that the extract herein studied meets the known chemical profile for BRP, already described in the literature (Bueno-Silva et al., 2015; Bueno-Silva, Bruno et al., 2017). In fact, five isoflavonoids (formononetin, vestitol, neovestitol, daidzein and biochanin A), one chalcone (isoliquiritigenin), one flavonone (liquiritigenin) and one flavonol (quercetin) were identified in our preparation of EERP through HPLC analysis (Supplementary Figure 1), which is in accordance with the literature (Bueno-Silva et al., 2017). The presence of isoflavonoids in this type of propolis, mainly formononetin, is a useful chemical marker for BRP and suggests new biological potentialities for this natural product.

#### 3.1. In vitro antiproliferative activity of EERP

Ten human tumor cell lines were treated for 48h with EERP at four concentrations (0.25, 2.5, 25 and 250  $\mu$ g/mL), in order to assess the antiproliferative activity of the extract. EERP promoted growth inhibition for all cell lines, including cytotoxic activity at 25 and 250  $\mu$ g/mL, without selectivity for a specific cell line. The concentration that promoted total growth inhibition after 48 h of treatment (total growth inhibition, TGI) ranged from 22.8 to 40.8  $\mu$ g/mL for cancer cells and 81.8  $\mu$ g/mL for the non-tumor cell line HaCaT (immortalized human keratinocyte) (Table 1).

Cell Lines	Total growth inhibition (µg/mL)	
	EERP	DOX
U251(glioma)	$22.8 \pm 3.1$	$0.51 \pm 0.3$
MCF7 (breast)	$40.8 \pm 9.0$	$0.38 \pm 0.2$
NCI/ADR-RES	$37.3 \pm 7.9$	$18.8 \pm 8.7$
(resistant ovary)		
786-0 (renal)	$28.5 \pm 5.2$	$2.5 \pm 1.2$
NCI-H460 (lung)	$32.5 \pm 6.4$	$12.4 \pm 0.6$
PC-3 (prostate)	$34.8 \pm 6.3$	$5.6 \pm 1.2$
OVCAR-3 (ovary)	$30.6 \pm 3.8$	$9.0 \pm 1.9$
HT-29 (colon)	$34.8 \pm 13.0$	$25.4 \pm 1.7$
K-562 (leukemia)	$24.4 \pm 5.2$	$2.6 \pm 0.7$
HaCat (non-tumoral)	$81.8 \pm 6.5$	$0.49 \pm 0.1$

**Table 1.** Concentration of EERP and doxorubicin (DOX), in  $\mu$ g/mL, necessary to promote total growth inhibition of the cell lines (TGI values) in 48 hours.

Concentrations that produce total growth inhibition (TGI) were determined from non-linear regression analysis using the ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation). Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) from four different experiments in triplicate.

# 3.2. Acute toxicity

No evidence of acute toxicity was observed in the first 4 h after oral treatment with EERP (1000 mg/kg), or during the following 15 days when the animals were kept under observation. Therefore, treatment with 1000 mg/kg of EERP, by oral route, was considered safe, so the following *in vivo* experiments were performed with 50, 100, and 200 mg/kg.

#### 3.3. Ehrlich solid tumor

This experiment was carried out with the purpose of evaluating the systemic action of the oral treatment with EERP on the proliferation of murine tumor cells *in vivo*. The read-out for the antiproliferative effect was the relative tumor weight, which is calculated as the tumor weight divided by the animal weight at the end of the experiment. The three doses of EERP tested presented antiproliferative activity in the Ehrlich solid tumor model, with a reduction in tumor growth rates of 40.38%, 39.21% and 37.89% for the treatments with 50, 100 and 200 mg/kg of EERP respectively, when compared to the negative control (Figure 1). The tumor growth rate for the positive control group DOX (Doxorubicin) was impeded by 47.02% compared to the negative control, with no statistical differences compared to the groups that received EERP (Figure 1).



**Figure 1.** Relative weight of Ehrlich solid tumor after 9 days of treatment with vehicle (PBS pH 7 + tween 80, oral route), EERP (50, 100 and 200 mg/kg, oral route) and DOX (Doxorubicin, 3 mg/kg, i.p. route). Relative tumor weight was expressed as tumor weight divided by body weight. N = 6 animals/group. Values are expressed as mean + SEM (One-way ANOVA, followed by Tukey post-test). <sup>a,b</sup> Different letters indicate significant difference (p< 0.05).

# 3.4. Carrageenan-induced paw edema

The carrageenan-induced paw edema in mice is biphasic; the first 6 h is a result from the activity of vasoactive agents (histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins) and the

second phase (after 6 h) is sustained by cytokines and other mediators released by leukocytes recruited to the inflammatory site. Therefore, in this model it is possible to determine the general anti-inflammatory profile of the extract. We observed that EERP at the dose of 200 mg/kg inhibited the edema in the first 24 h, with a greater reduction between 3 h and 6 h, and kept the edema controlled until the end of the experiment (Figure 2A). The positive control Piroxicam, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), reduced the 4.5 h peak by 44.96%, while EERP highest dose reduced this peak by 67.47%. The treatment with 100 mg/kg of EERP presented the same profile as Piroxicam in the first 24 hours, but on the other hand, the dose of 50 mg/kg of EERP was not effective in inhibiting edema formation at any time point (Figure 2A). Since the treatment with 200 mg/kg of EERP was the most effective and inhibited the inflammatory process since the first hours, mainly targeting the vascular phase of inflammatory potential, using several vasoactive mediators (histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandin E<sub>2</sub>).

#### 3.5. Compound 48/80-induced paw edema

Compound 48/80 was used to induce an inflammatory process by promoting degranulation of mast cells, culminating in histamine and serotonin release. The positive control (ciproheptadine, 4 mg/kg) and EERP presented similar activity. Compared to basal levels, the % of edema after 15 minutes of the induction with compound 48/80 was only 9.9% for ciproheptadine and 11.59% for EERP, both inhibiting the inflammatory peak (Figure 2B). Both ciproheptadine and EERP showed activity up to two hours after the injection of compound 48/80, with inhibitory rates of 63.77% and 67.51% respectively at the end of the experiment (120 minutes after the inflammatory stimulus) (p <0.05).

#### 3.6. Bradykinin-induced paw edema

Bradykinin (30 µg/paw) produced a maximal inflammatory peak after 15 minutes, followed by progressive decrease of edema (Figure 2C). Both Dexa (5 mg/kg) and EERP were able to inhibit edema formation after 15 minutes. In the first 30 minutes, Dexa reached the maximum inhibition of edema (55.87%) while the EERP inhibited 61.93% at the same time point, with anti-inflammatory activity maintained up to 60 minutes after the inflammatory stimulus (p <0.05) (Figure 2C).

# 3.7. Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced paw edema

The intraplantar administration of prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>) produced an inflammatory peak after 30 minutes of inflammatory stimulus, followed by a progressive decrease of the

edema (Figure 2D). Piroxicam, a NSAID, was used as positive control and as expected, efficiently inhibited the inflammatory peaks (15 and 30 minutes after stimulus) (Figure 2D). EERP had a similar profile, as it was able to inhibit the 15 minutes inflammatory peak by 50.6% and this activity was more pronounced 30 min after the stimulus (64.8%).



**Figure 2.** A) Activity of EERP in the carrageenan-induced paw edema assay. Vehicle (PBS pH 7 + tween 80), Piroxicam (40 mg/kg) and EERP (50, 100 and 200 mg/kg) were administered orally one hour before the intraplantar injection of 3% carrageenan. N = 6 animals/group. B) Activity of EERP in the compound 48/80-induced paw edema assay. Vehicle (PBS pH 7 + tween 80), Ciproheptadine (4 mg/kg) and EERP (200 mg/kg) were administered orally 30 minutes before the intraplantar injection of compound 48/80. C) Activity of EERP in the Bradykinin-induced paw edema assay. Vehicle (PBS pH 7 + tween 80), dexamethasone (Dexa, 5 mg/kg) and EERP (200 mg/kg) were administered orally 30 minutes before the intraplantar injection of bradykinin. D) Activity of EERP in the Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced paw edema assay. Vehicle (PBS pH 7 + tween 80), piroxicam (20 mg/kg) and EERP (200 mg/kg) were administered orally 30 minutes before the intraplantar injection of bradykinin. D) Activity of EERP in the Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced paw edema assay. Vehicle (PBS pH 7 + tween 80), piroxicam (20 mg/kg) and EERP (200 mg/kg) were administered orally 30 minutes before the intraplantar injection of PGE<sub>2</sub>. Paw edema was determined in different time points using a plethysmometer apparatus, and expressed as the % of edema compared to the basal volume (before carrageenan administration). Values expressed as mean + SEM (Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). \*p < 0.05 \*\*p < 0.01 \*\*\*p < 0.001 compared to vehicle.

#### 3.8. Croton oil-induced ear edema

Croton oil induces an inflammatory process dependent on prostaglandins and here was used to evaluate the possible topical anti-inflammatory activity of EERP. The positive control group (Dexa) reduced the ear edema by 87.82% (1.57 mg  $\pm$  1.69). The topical application of EERP (200 mg/mL) reduced the edema formation by 53.95% (5.94 mg  $\pm$  1.28) when compared to the negative control (12.90 mg  $\pm$  1.81) (Figure 3A).

3.9. Assessment of neutrophil activation

In order to evaluate the action of EERP on the activation of neutrophils and therefore the migration of these cells to the focus of the injury (croton oil-treated ears), the levels of the enzyme myeloperoxidase (MPO), an peroxidase enzyme mainly expressed by neutrophils, were evaluated and are presented in Figure 3B. Regarding the levels of MPO, we observed that EERP was as potent as Dexa in inhibiting the activation or migration of neutrophils to the inflamed site (50.21% and 46.01% of inhibition respectively), which is in accordance with the lower edema observed for these treatments (Figure 3A).

A

B



**Figure 3.** A) Topical effect of EERP on the croton oil induced ear edema assay. Vehicle (acetone 70%), dexamethasone (Dexa, 5 mg/mL) and EERP (200 mg/mL) were topically applied 1 hour before the topical application of croton oil or acetone 70%. The edema was determined by the weight difference between the left and right ears. B) Topical effect of EERP on the activation and migration of neutrophils in the croton oil-induced ear edema. Neutrophil activation and migration were translated from the O.D (optical density) of myeloperoxidase enzyme levels per milligram of ear obtained from the different experimental groups. Values were expressed as the mean + SEM of 7 animals per group. (One-way ANOVA, followed by Tukey post-test). <sup>a,b,c</sup> Different letters indicate a significant difference (p< 0.05).

#### 4. DISCUSSION

The use of medicinal plants and others natural products in the treatment of diseases continues to play a highly significant role in drug discovery and development (de Mendonça et al., 2015). Propolis, in its various types (green, brown, red), stands out due to its diverse pharmacological properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, wound healing, among others (Berretta et al., 2017; Castaldo and Capasso, 2002; Toreti et al., 2013). Especially, Brazilian Red Propolis (BRP) is considered a unique product due its high contents of isoflavonoids, which together with phenolic acids and triterpenes, provide several pharmacological benefits (Berretta et al., 2017; Freires et al., 2016; Machado et al., 2016). Among the most reported actions are antibacterial and antifungal, which suggest that BRP has antiproliferative activities and could play a role in the prevention and treatment of cancer. In fact, several studies report the antiproliferative effect of BRP against tumor cell lines (Dantas Silva et al., 2017; de Mendonça et al., 2015). Moreover, several *in vitro* studies report its antiinflammatory activities, reinforcing a potential action in the tumor microenvironment (Bueno-Silva et al., 2016; Bueno-Silva et al., 2015). Although BRP has been used traditionally for years, most of these actions were scientifically vetted in in vitro systems or using the isolated compounds, not being representative of the form of consumption in folk medicine, which is the ethanolic extract. Therefore, in this study we evaluated the anticancer and antiinflammatory activities of the ethanolic extract from BRP (EERP) using a murine model of cancer and several murine models of inflammation.

Because many of the studies concerning the antiproliferative activity of BRP were performed using tumor cell lines, in a first step we validated the EERP in ten human tumor cell lines, and we observed that it promoted growth inhibition and cytotoxicity in a concentration-dependent way. These findings are in agreement with previous studies showing the cytotoxic activity of BRP against different human tumor cell lines, such as 5637 (bladder carcinoma), HeLa (cervical adenocarcinoma), K562 (chronic myelogenous leukemia), Nalm6 (B cell precursor leukemia), RC-58T/h/SA#4 (prostate) and the murine cell line B16F10 (melanoma) (Freires et al., 2016). Although in the cancer drug discovery pipeline initial *in vitro* screenings are performed to identify substances that potentially interfere with either cell metabolism or cell survival, these studies should be complemented with *in vivo* studies, as *in vitro* models do not always replicate the actions seen *in vivo*, due to possible metabolization and other systemic effects of the potential new drug (Atanasov et al., 2015)

Our results demonstrated that the *in vitro* activity of EERP was further confirmed *in vivo*, using animal models that displayed its antitumor and anti-inflammatory activities. Importantly, prior to initiating the *in vivo* assays, the acute toxicity test was performed to evaluate the general side effects and the possible lethality of the extract, allowing the selection of safe doses for the studies in experimental models of cancer and inflammation. Animals orally treated with EERP (1000 mg/kg) showed no severe clinical side effects and no mortality. Based on these results, the *in vivo* anticancer and anti-inflammatory assays were conducted with 50, 100 and 200 mg/kg of EERP, by oral route.

The murine cancer model used in this study, the Ehrlich solid tumor, is an undifferentiated hyperdiploid carcinoma that has the capacity to be transplantable. In this model, regression does not occur and the rapid development of the tumor reduces the study time, thus constituting an aggressive and short-lived tumor model (Cespedes et al., 2006; Stewart, 1959). Although this is a very aggressive model, treatments with the three doses of EERP were able to decrease tumor growth, similarly to the chemotherapy drug doxorubicin, widely used in the clinics. These data confirmed the potent antiproliferative action of EERP already observed in the *in vitro* studies. Moreover, because tumor cells were inoculated in the back of the animal and treatments were performed by oral route, we could confirm that EERP has systemic effects, without toxicity in the therapeutic doses.

Ehrlich tumor cells induce an inflammatory response, characterized by increased vascular permeability, edema formation and immune cell infiltration (Fernandes, P.D. et al., 2015). In this way, anti-inflammatory drugs have a beneficial effect in this model, and this could be the case of EERP, with its anti-inflammatory action synergizing with its antiproliferative activity. It is known that the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as adjuvants in cancer therapy is an interesting approach, as it targets different inflammatory mediators that promote tumor proliferation and survival (de Groot et al., 2007). This inflammatory response is an important player in the tumor microenvironment, and can be generated either by tumor cells themselves, in a process called tumor-elicited inflammation (Wang and Karin, 2015) or by other components of the tumor microenvironment, such as immune cells, fibroblasts, endothelial cells, which results in a chronic inflammatory process that promotes cancer development and progression (Elinav et al., 2013; Wang and Karin, 2015) Moreover, it is known that chronic inflammatory processes also predispose tissues for the accumulation of mutations, which may ultimately lead to carcinogenesis, due to generation of oxidative stress, intense infiltration of immune cells and unresolved inflammatory stimuli (Grivennikov et al., 2010; Vendramini-Costa and Carvalho, 2012).

Therefore, targeting the inflammatory microenvironment in cancer is an important approach in the prevention and control of cancer.

The in vitro and in vivo antitumor effects of EERP prompted us to explore its antiinflammatory effects. To begin, we used the carrageenan-induced paw edema, which in mice is characterized by a biphasic edema that develops in the first 6 h, followed by a second phase that starts at 24 h and reaches its peak between 48 and 72 h after carrageenan injection (Posadas et al., 2004). In the first phase, minutes after carrageenan injection, there is release of vasoactive mediators, such as histamine, bradykinin and serotonin, by cells present locally in the tissue (Morris, 2003). Following this step, from 2 to 4 h after carrageenan injection, there is the peak of prostaglandins, which contribute to the increased vascular permeability and infiltration of neutrophils, and this phase can be inhibited by NSAIDs (Bartosikova, 2013). At this point, recruited neutrophils can release reactive oxygen species, additional nitric oxide and inflammatory cytokines, amplifying the inflammatory response. After 24 h, the inflammatory response is sustained by the release of nitric oxide and cytokines by recruited and activated neutrophils (Posadas et al., 2004). The final phase is known as the "clearance" step, when monocytes and macrophages are recruited to resolve the inflammation (Buckley et al., 2014). All the steps described above characterize the sequence of events that generally happens during an acute inflammatory process. Therefore, this model is an important first step to understand how the potential anti-inflammatory compound works.

EERP was evaluated in 3 doses: 50, 100 and 200 mg/kg. EERP showed dosedependent activity, with the highest dose (200 mg/kg) inhibiting the formation of edema from the first hours until the end of the experiment, with a more significant reduction between 3 and 6 h after the induction of inflammation. This profile suggests an action on vasoactive mediators that have been released minutes after the pro-inflammatory stimulus, such as histamine, serotonin and bradykinin, culminating with inhibition of prostaglandin release (Bartosikova, 2013; Morris, 2003). Treatments with the 100 mg/kg dose were able to inhibit the first inflammatory peak that occurred between 3 and 4.5 h, which coincides with the prostaglandin production phase, suggesting an inhibitory action on arachidonic acid metabolism or directly on cyclooxygenase 1 or 2 (COX-1 or 2), leading to inhibition of prostaglandin release. Supporting this hypothesis, the positive control Piroxicam, a NSAID that inhibits the action of COX-1 and COX-2 (Vane and Botting, 1997), also inhibited the generation of this first peak. Interestingly, Piroxicam had the same profile of action presented by EERP in the 100 mg/kg dose, which reinforces that treatments with this dose of EERP could simulate the effect of NSAIDs. On the other hand, the 50 mg/kg dose was not effective in decreasing the edema when compared to the negative control. All together, these results suggest that EERP potentially inhibits the activity or production of vasoactive mediators and prostaglandins. In order to further investigate the anti-inflammatory activity of the EERP, we conducted several paw edema models induced by different mediators, representative of the phases most affected by treatments with EERP in the carrageenan-induced paw edema study. The 200 mg/kg dose was selected as this was the dose that inhibited different phases of the inflammatory process.

Histamine and serotonin, the earliest mediators in the inflammatory cascade, are vasoactive amines produced and stored by mast cells, basophils and platelets. Upon inflammatory stimuli, these mediators are released and promote a vasoactive effect, leading to vasodilation and increased vascular permeability (Medzhitov, 2008; Schneider et al., 2010). As a result, there is an inflammatory exudate locally, with neutrophils migrating to the site of injury (Medzhitov, 2008). Here, compound 48/80, a degranulator of mast cells, was used to induce a histamine/serotonin-dependent paw edema (Silva et al., 2017). EERP was as efficient as the positive control cyproheptadine (a H1 and 5-HT1A receptor antagonist), suggesting that it could directly or indirectly stabilize mast cell membranes or act as a receptor antagonist. This would explain the anti-inflammatory effects seen earlier during the inflammatory process.

Another vasoactive mediator is bradykinin, which can be generated in response to tissue damage, allergic reactions and infections (Campos and Calixto, 1995), being one of the first mediators to be released locally, together with histamine and serotonin. Bradykinin acts through the G protein-coupled receptors B2 (constitutively expressed) and B1 (induced upon inflammation and infections), inducing activation of endothelial cells and therefore vasodilation, vascular permeability, production of nitric oxide, plasma extravasation, cell migration and production and release of pro-inflammatory mediators derived from the arachidonic acid pathway, including prostaglandins (Kaplan et al., 2002). In our study, treatment with EERP inhibited bradykinin-induced paw edema similarly to the positive control dexamethasone, suggesting modulation of the bradykinin pathway at some level, either through interaction with the receptors, or consecutive inhibition of histamine/serotonin release. Inhibition of the bradykinin pathway affects eicosanoid production through activation of PLA<sub>2</sub>, an enzyme that mediates the release of arachidonic acid (precursor of eicosanoids) from membrane phospholipids (Kaplan and Joseph, 2014; Smith, 1992). In fact, the positive control dexamethasone, which is known to inhibit the induction of B1 receptors, also inhibits eicosanoids production by inhibiting the activity of PLA<sub>2</sub> (Passos et al., 2004; Yao et al., 1999). Similarly, treatment with EERP affected the activity of eicosanoids, showed by the inhibition of the PGE<sub>2</sub>-induced paw-edema. The inoculation of PGE<sub>2</sub> leads to increased vasodilation, chemokine and cytokine production and leukocyte migration, in a process that amplifies the inflammatory response. It is also known that PGE<sub>2</sub>, together with bradykinin, is involved in the generation of neurogenic inflammation by activation of sensory fibers, resulting in acute pain (Claudino et al., 2006; Petho and Reeh, 2012). Therefore, the combined anti-inflammatory actions of EERP in the several models of paw edema induced by different mediators confirm that Brazilian Red Propolis has an important effect on the vascular phase of inflammation, resulting in decreased vascular permeability and smaller edema formation, possibly inhibiting leukocyte recruitment to the site of inflammation.

Inhibition of leukocyte recruitment and activation was confirmed using the croton oilinduced ear edema in mice. The ear edema model has been used as a screening for compounds with potential topical and systemic anti-inflammatory action for years (Murakawa et al., 2006; Tubaro et al., 1986). Croton oil induces an inflammatory process characterized by the activation of arachidonic acid metabolism and consequent production of prostaglandins through the activation of cyclooxygenases (COX) and lipoxygenases (LOX) (Carlson et al., 1985; Otuki et al., 2005). Topical application of the EERP was able to reduce edema formation and neutrophils recruitment and/or activation as indicated by the inhibition of the enzyme myeloperoxidase (MPO) activity. MPO, which is an enzyme found in the azurophilic granules of neutrophils, is used as an indicator of the chemotaxis process and the presence of leukocytes in inflammatory exudates (Silva et al., 2017). Therefore, it can be suggested that the smaller edema presented by the animals treated with EERP is a consequence of the decreased migration/activation of neutrophils to the site of the inflammatory stimulus, which can be attributed to the decreased vascular permeability.

Several studies show the anti-inflammatory action of BRP using *in vitro* systems. Treatment of LPS-stimulated peritoneal macrophages with EERP resulted in inhibition of NFκB pathway and of several cytokines and chemokines (Bueno-Silva et al., 2015; Bueno-Silva, B. et al., 2017), which could be a consequence of the inhibitory action on migration and activation of leukocytes to the inflammatory site, as demonstrated by us in this study and others (Bueno-Silva et al., 2016). Some of the compounds present in BRP show great antiinflammatory activity through different pathways (Franchin et al., 2017). Formononetin, an important compound found in BRP and also detected in our preparation of EERP, showed inhibitory activity on leukocyte migration and exhibited an antidematogenic effect in a paw edema assay (Lima Cavendish et al., 2015). Vestitol acts by inhibiting neutrophil migration, rolling and adhesion, CXCL1/KC and CXCL2/MIP2 secretion and neutrophil chemotaxis (Franchin et al., 2016). Isoliquiritigenin inhibits the adhesion of neutrophils by downregulating the expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in endothelial cells (Franchin et al., 2017; Oldoni et al., 2011). Here, we show that EERP displayed antiinflammatory effects similarly to key compounds present in its composition and previously identified in BRP. Moreover, we observed a potent antitumor activity *in vivo*, demonstrating that the consumption of EERP could be beneficial for cancer prevention through its antiinflammatory and antiproliferative activities.

# **5. CONCLUSIONS**

In sum, herein we show the antitumoral and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract from Brazilian Red Propolis (EERP), a unique product from the Northeast region of Brazil. The combined antitumoral and anti-inflammatory activities suggest that EERP targets multiple hallmarks of cancer, directly affecting tumor cell proliferation and the tumor environment, possibly modulating tumorigenesis and tumor-associated inflammation. In addition, we show that the oral consumption of BRP, in the same way that it is used popularly, possesses a systemic effect and was able to inhibit tumor growth, without side effects in the therapeutic doses, suggesting good bioavailability and absence of toxicity. These results indicate EERP as an agent to be explored for potential use in combinatory therapies for modulation of acute or chronic inflammatory processes and potentially in the prevention of cancer.

# **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), [grant number 2013/24416-1] and The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). We would like to thank Dr. Ralph Francescone (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA) for the advice concerning English grammar and spelling.

#### Author contributions

Conceptualization, T.P.B, D.B.V.C., J.E.C; Investigation, T.P.B, F.R.N., F.F.J., P.A.M., R.R.T.Z., S.V.T.; Resources, S.M.A., J.E.C.; Writing - Original Draft, T.P.B., D.B.V.C.; Writing – Review and Editing, T.P.B., F.R.N., S.M.A., A.L.T.G.R., D.B.V.C.; Supervision, D.B.V.C., J.E.C.; Funding Acquisition, T.P.B., J.E.C.

#### References

Alencar, S.M., Oldoni, T.L., Castro, M.L., Cabral, I.S., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. J Ethnopharmacol 113(2), 278-283.

Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology advances 33(8), 1582-1614.

Barbosa Bezerra, G., de Menezes de Souza, L., Dos Santos, A.S., de Almeida, G.K., Souza, M.T., Santos, S.L., Aparecido Camargo, E., Dos Santos Lima, B., de Souza Araujo, A.A., Cardoso, J.C., Gomes, S.V., Gomes, M.Z., de Albuquerque, R.L.J., 2017. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 85, 687-696.

Barros, M.P., Lemos, M., Maistro, E.L., Leite, M.F., Sousa, J.P., Bastos, J.K., Andrade, S.F., 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. J Ethnopharmacol 120(3), 372-377.

Bartosikova, J.N.L., 2013. Carrageenan: a Review. Veterinarni Medicina 58(4), 187-205.

Berretta, A., Arruda, C., Galeti Miguel, F., Baptista, N., Piacezzi Nascimento, A., Marquele-Oliveira, F., Issa Hori, J., Barud, H., Damaso, B., Ramos, C., Ferreira, R., Bastos, J., 2017. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market.

Bradley, P.P., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. Blood 60(3), 618-622.

Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Serhan, C.N., 2014. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. Immunity 40(3), 315-327.

Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L., 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. J Agric Food Chem 61(19), 4546-4550.

Bueno-Silva, B., Franchin, M., Alves, C.F., Denny, C., Colon, D.F., Cunha, T.M., Alencar, S.M., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L., 2016. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process.

Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology 23(13), 1583-1590.

Bueno-Silva, B., Kawamoto, D., Ando-Suguimoto, E.S., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., Mayer, M.P., 2015. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. PLoS One 10(12), e0144954.

Bueno-Silva, B., Kawamoto, D., Ando-Suguimoto, E.S., Casarin, R.C.V., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., Mayer, M.P.A., 2017. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. Journal of Ethnopharmacology 207, 100-107.

Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2017. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. Nat Prod Res 31(11), 1318-1324.

Bufalo, M.C., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Batista, M.T., Sforcin, J.M., 2013. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-kappaB and MAPK activation in macrophages. J Ethnopharmacol 149(1), 84-92.

Campos, M.M., Calixto, J.B., 1995. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. British journal of pharmacology 114(5), 1005-1013.

Carlson, R.P., O'Neill-Davis, L., Chang, J., Lewis, A.J., 1985. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. Agents and actions 17(2), 197-204.

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

Cespedes, M.V., Casanova, I., Parreno, M., Mangues, R., 2006. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico 8(5), 318-329.

Claudino, R.F., Kassuya, C.A., Ferreira, J., Calixto, J.B., 2006. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 318(2), 611-618.

Cuzick, J., Otto, F., Baron, J.A., Brown, P.H., Burn, J., Greenwald, P., Jankowski, J., La Vecchia, C., Meyskens, F., Senn, H.J., Thun, M., 2009. Aspirin and non-steroidal antiinflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. The Lancet. Oncology 10(5), 501-507.

Dantas Silva, R.P., Machado, B.A., Barreto, G.A., Costa, S.S., Andrade, L.N., Amaral, R.G., Carvalho, A.A., Padilha, F.F., Barbosa, J.D., Umsza-Guez, M.A., 2017. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. PLoS One 12(3), e0172585.

de Castro, P.A., Savoldi, M., Bonatto, D., Barros, M.H., Goldman, M.H., Berretta, A.A., Goldman, G.H., 2011. Molecular characterization of propolis-induced cell death in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryotic cell 10(3), 398-411.

de Groot, D.J., de Vries, E.G., Groen, H.J., de Jong, S., 2007. Non-steroidal antiinflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. Critical reviews in oncology/hematology 61(1), 52-69.

de Mendonça, I.C.G., Porto, I.C.C.d.M., do Nascimento, T.G., de Souza, N.S., Oliveira, J.M.d.S., Arruda, R.E.d.S., Mousinho, K.C., dos Santos, A.F., Basílio-Júnior, I.D., Parolia, A., Barreto, F.S., 2015. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 15(1).

de Oliveira, J.F., Nonato, F.R., Zafred, R.R.T., Leite, N.M.S., Ruiz, A., de Carvalho, J.E., da Silva, A.L., de Moura, R.O., Alves de Lima, M.D.C., 2016. Evaluation of anti-

inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)thiosemicarbazone. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 80, 388-392.

Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C.A., Hu, B., Jin, C., Flavell, R.A., 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. Nature reviews. Cancer 13(11), 759-771.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer 136(5), E359-386.

Fernandes, F.H., da, R.G.Z., Violante, I.M.P., Lopes, T.F.S., Garcez, W.S., Garcez, F.R., 2015. Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. Toxicology reports 2, 1482-1488.

Fernandes, P.D., Guerra, F.S., Sales, N.M., Sardella, T.B., Jancar, S., Neves, J.S., 2015. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. Journal of pharmacological and toxicological methods 71, 83-89.

Fonseca, Y.M., Marquele-Oliveira, F., Vicentini, F.T., Furtado, N.A., Sousa, J.P., Lucisano-Valim, Y.M., Fonseca, M.J., 2011. Evaluation of the Potential of Brazilian Propolis against UV-Induced Oxidative Stress. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2011.

Franchin, M., Colon, D.F., Castanheira, F.V., da Cunha, M.G., Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Cunha, T.M., Rosalen, P.L., 2016. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. Journal of natural products 79(4), 954-960.

Franchin, M., Freires, I.A., Lazarini, J.G., Nani, B.D., da Cunha, M.G., Colon, D.F., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2017. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. Eur J Med Chem.

Freires, I.A., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2016. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. European Journal of Medicinal Chemistry 110, 267-279.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. Cell 140(6), 883-899.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144(5), 646-674.

Kaplan, A.P., Joseph, K., 2014. Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway. Advances in immunology 121, 41-89.

Kaplan, A.P., Joseph, K., Silverberg, M., 2002. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. The Journal of allergy and clinical immunology 109(2), 195-209.

Lima Cavendish, R., de Souza Santos, J., Belo Neto, R., Oliveira Paixao, A., Valeria Oliveira, J., Divino de Araujo, E., Berretta, E.S.A.A., Maria Thomazzi, S., Cordeiro Cardoso, J., Zanardo Gomes, M., 2015. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. J Ethnopharmacol 173, 127-133.

Lopes, A.A., Ferreira, T.S., Nesi, R.T., Lanzetti, M., Pires, K.M., Silva, A.M., Borges, R.M., Silva, A.J., Valenca, S.S., Porto, L.C., 2013. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. Bioorg Med Chem 21(24), 7570-7577.

Machado, B.A., Silva, R.P., Barreto Gde, A., Costa, S.S., Silva, D.F., Brandao, H.N., Rocha, J.L., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Umsza-Guez, M.A., Padilha, F.F., 2016. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. PLoS One 11(1), e0145954.

Machado, J.L., Assuncao, A.K., da Silva, M.C., Dos Reis, A.S., Costa, G.C., Arruda D de, S., Rocha, B.A., Vaz, M.M., Paes, A.M., Guerra, R.N., Berretta, A.A., do Nascimento, F.R., 2012. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2012, 157652.

Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. Nature 454(7203), 428-435.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., et al., 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. Journal of the National Cancer Institute 83(11), 757-766.

Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. Methods in molecular biology 225, 115-121.

Murakawa, M., Yamaoka, K., Tanaka, Y., Fukuda, Y., 2006. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. Biochemical pharmacology 71(9), 1331-1336.

Nani, B.D., Franchin, M., Lazarini, J.G., Freires, I.A., da Cunha, M.G., Bueno-Silva, B., de Alencar, S.M., Murata, R.M., Rosalen, P.L., 2018. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. Phytotherapy research : PTR 32(4), 750-754.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of natural products 79(3), 629-661.

OECD, 2008. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure.

Oldoni, T.L.C., Cabral, I.S.R., d'Arce, M.A.B.R., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., Nascimento, A.M., Alencar, S.M., 2011. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. Separation and Purification Technology 77(2), 208-213.

Orsolic, N., Basic, I., 2003. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. J Ethnopharmacol 84(2-3), 265-273.

Otuki, M.F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from Protium kleinii and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. European journal of pharmacology 507(1-3), 253-259.

Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J Agric Food Chem 50(9), 2502-2506.

Passos, G.F., Fernandes, E.S., Campos, M.M., Araujo, J.G., Pesquero, J.L., Souza, G.E., Avellar, M.C., Teixeira, M.M., Calixto, J.B., 2004. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. Journal of immunology 172(3), 1839-1847.

Petho, G., Reeh, P.W., 2012. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. Physiological reviews 92(4), 1699-1775.

Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. British journal of pharmacology 142(2), 331-338.

Ribeiro, D.R., Alves, Â.V.F., dos Santos, E.P., Padilha, F.F., Gomes, M.Z., Rabelo, A.S., Cardoso, J.C., Massarioli, A.P., de Alencar, S.M., de Albuquerque-Júnior, R.L.C., 2015. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 117(2), 85-95. Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. Journal of the Science of Food and Agriculture 91(13), 2363-2370.

Schinella, G., Neyret, E., Console, G., Tournier, H., Prieto, J.M., Rios, J.L., Giner, R.M., 2014. An aqueous extract of Ilex paraguariensis reduces carrageenan-induced edema and inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in animal models of inflammation. Planta medica 80(12), 961-968.

Schneider, E., Leite-de-moraes, M., Dy, M., 2010. Histamine, immune cells and autoimmunity. Advances in experimental medicine and biology 709, 81-94.

Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? J Ethnopharmacol 133(2), 253-260.

Shimizu, T., Takeshita, Y., Takamori, Y., Kai, H., Sawamura, R., Yoshida, H., Watanabe, W., Tsutsumi, A., Park, Y.K., Yasukawa, K., Matsuno, K., Shiraki, K., Kurokawa, M., 2011. Efficacy of Brazilian Propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice and Their Modes of Antiherpetic Efficacies. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2011, 976196.

Shoemaker, R.H., 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. Nature reviews. Cancer 6(10), 813-823.

Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 5(3), 313-316.

Silva, I.S., Nicolau, L.A.D., Sousa, F.B.M., de Araujo, S., Oliveira, A.P., Araujo, T.S.L., Souza, L.K.M., Martins, C.S., Aquino, P.E.A., Carvalho, L.L., Silva, R.O., Rolim-Neto, P.J., Medeiros, J.V.R., 2017. Evaluation of anti-inflammatory potential of aqueous extract, and polysaccharide fraction of Thuja occidentaiis Linn. in mice. Int J Biol Macromol 105, 1105-1116.

Smith, W.L., 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. The American journal of physiology 263(2 Pt 2), F181-191.

Stewart, H.L., 1959. The cancer investigator. Cancer research 19, 804-818.

Takemura, T., Urushisaki, T., Fukuoka, M., Hosokawa-Muto, J., Hata, T., Okuda, Y., Hori, S., Tazawa, S., Araki, Y., Kuwata, K., 2012. 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, a Major Constituent of Brazilian Propolis, Increases TRAIL Expression and Extends the Lifetimes of Mice Infected with the Influenza A Virus. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2012, 946867.

Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013, 1-13.

Tubaro, A., Dri, P., Melato, M., Mulas, G., Bianchi, P., Del Negro, P., Della Loggia, R., 1986. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drug (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. Agents and actions 19(5-6), 371-373.

Ulrich, C.M., Bigler, J., Potter, J.D., 2006. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. Nature reviews. Cancer 6(2), 130-140.

Vane, J.R., Botting, R.M., 1997. Mechanism of action of aspirin-like drugs. Seminars in arthritis and rheumatism 26(6 Suppl 1), 2-10.

Vendramini-Costa, D.B., Carvalho, J.E., 2012. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. Current pharmaceutical design 18(26), 3831-3852.

Vendramini-Costa, D.B., Spindola, H.M., de Mello, G.C., Antunes, E., Pilli, R.A., de Carvalho, J.E., 2015. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of racemic goniothalamin, a styryl lactone. Life sciences 139, 83-90.

Wang, K., Karin, M., 2015. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. Advances in cancer research 128, 173-196.

Yao, X.L., Cowan, M.J., Gladwin, M.T., Lawrence, M.M., Angus, C.W., Shelhamer, J.H., 1999. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity. The Journal of biological chemistry 274(24), 17202-17208.

#### Efeito do extrato etanólico da própolis vermelha no câncer de próstata

# Considerações sobre o Capítulo 2

O capítulo 2 trata do estudo "Própolis vermelha brasileira causa um atraso na progressão do câncer de próstata em camundongos TRAMP através da indução de parada do ciclo celular e morte celular." ou "Brazilian Red Propolis causes a delay in prostate cancer progression in TRAMP mice through induction of cell cycle arrest and cell death.", que será submetido para publicação no periódico 'The prostate'. Essa parte do estudo teve como objetivo avaliar a atividade do extrato etanólico da própolis vermelha brasileira (EEPV) no desenvolvimento de câncer de próstata in vivo utilizando o modelo de camundongo transgênico para o adenocarcinoma (TRAMP) e também seu potencial antiproliferativo em células PC-3 (adenocarcinoma da próstata humana). Os animais foram divididos em três grupos (n = 10): T8 (grupo controle de 8 semanas de idade) para estabelecer o grau inicial de lesão; T12 (grupo controle de 12 semanas de idade) tratado oralmente com veículo (PBS+1% Tween 80, 10 mL / kg) e grupo TEERP tratado oralmente com 50 mg / kg / dia de EERP, de 8 a 12 semanas de idade. Após 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os lóbulos ventrais da próstata foram coletados para análises estruturais, imunohistoquímicas e proteicas. Também foi realizada uma determinação preliminar dos mecanismos de ação dos efeitos antiproliferativos induzidos por EEPV e morte celular em células PC-3, avaliando os efeitos no ciclo celular e o envolvimento de apoptose e necroptose. Análises morfológicas em camundongos TRAMP indicaram que o tratamento com EEPV retardou a progressão do adenocarcinoma prostático, reduziu a proliferação de células epiteliais e diminuiu a expressão de COX-2, conferindo um ambiente tumoral menos agressivo e de menor suporte para o desenvolvimento de tumores. Estudos in vitro com células PC-3 confirmaram os resultados in *vivo*; EEPV foi capaz de inibir a proliferação celular por induzir a interrupção do ciclo celular na fase G1 e induzir a morte celular por vias de sinalização comuns a apoptose e necroptose. O presente estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos da EEPV no desenvolvimento do tumor de próstata *in vivo*, usando a forma popular de consumo de PVB, que é o extrato etanólico. Devido à sua característica multi-alvo, o EEPV pode se tornar uma alternativa para ser usado em terapias combinatórias, através de seus efeitos anti-inflamatórios e indução de diferentes tipos de morte celular.

# Brazilian Red Propolis causes a delay in prostate cancer progression in TRAMP mice through induction of cell cycle arrest and cell death.

Thais Petrochelli Banzato<sup>1,2</sup>, Raquel Frenedoso da Silva<sup>1</sup>, Ralph Francescone<sup>3</sup>, Larissa Akemi Kido<sup>1</sup>, Edna Cukierman<sup>3</sup>, Severino Matias de Alencar<sup>4</sup>, João Ernesto de Carvalho<sup>1,5</sup>, Débora Barbosa Vendramini-Costa<sup>3\*,#</sup>; Valéria Helena Alves Cagnon<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center, CPQBA, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Cancer Biology Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

<sup>4</sup>Department of Agri-food Industry, Food and Nutrition, 'Luiz de Queiroz' College of Agriculture, University of São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

\* Corresponding author: Fox Chase Cancer Center, 999 Cottman Ave, Room W428, Philadelphia, PA 19111, USA. E-mail address: vendramini.debora@gmail.com
E-mail may also be addressed to Thais Petrochelli Banzato (thaisbanzato@gmail.com).
# co-last authors.

# ABSTRACT

Prostate cancer has been widely studied because of the high incidence among men, in addition to the complexity of the factors involved in the development and progression of this disease. Natural products are a major source of effective drugs for cancer treatment and often inspire the development of new potential agents. Brazilian Red Propolis (BRP), collected from Alagoas State, northeast of Brazil, presents a unique chemical composition enriched in isoflavones and its biological properties still need to be explored. This study aimed to investigate the activity of the ethanolic extract from BRP (EERP) in the development of prostate cancer in vivo using the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model and also its antiproliferative potential in PC-3 cells (human prostate adenocarcinoma). Animals were divided into three groups (n=10): T8 (8 week old control group) in order to establish the initial lesion grade; T12 (12 week old control group) treated orally with vehicle (PBS, 10 mL / kg) and TEERP group treated orally with 50 mg/ kg/ day of EERP, from 8 to 12 weeks of age. After 30 days of treatment, the animals were euthanized and the prostate ventral lobes were collected for structural, immunohistochemistry and protein level analyses. We also accomplished a preliminary determination of the mechanisms of action of EERPinduced antiproliferative effects and cell death in PC-3 cells, by evaluating the effects on the cell cycle and the involvement of apoptosis and necroptosis. Morphological analyses in TRAMP mice indicated that EERP treatment delayed prostatic adenocarcinoma progression, reduced epithelial cell proliferation and decreased COX-2 expression, conferring a less aggressive tumor environment and less support for tumor development. In vitro studies with PC-3 cells confirmed the results in vivo; EERP was able to inhibit cell proliferation by inducing cell cycle arrest in the G1 phase and to induce cell death by a combination of apoptosis and necroptosis. The present study is the first to demonstrate the effects of EERP in prostate tumor development in vivo, using the popular form of BRP consumption, which is the ethanolic extract. Because of its multi-target characteristics, EERP may become an alternative to be used in combinatorial therapies, through its anti-inflammatory effects and induction of different types of cell death.

**KEYWORDS:** Propolis, Brazilian red propolis, Prostate Cancer, Antiproliferative effect, Cell death, Apoptosis, Tumor microenvironment.

#### **INTRODUCTION**

Prostate cancer is one of the most commonly diagnosed cancers in men, accounting for almost 1 in 5 new diagnoses and ranked third in cancer-related deaths, which affect mostly men in the western societies (Siegel et al., 2018; Awad et al., 2018). The established risk factors for the disease include age, ethnicity, diet, family history and genetic conditions (Chen et al., 2018).

In prostate carcinoma, proliferation of tumor cells occurs beyond the basement membrane invading the stroma, which supports tumor development; the imbalance of the epithelial-stroma interaction in the prostate favors the formation of a new microenvironment called reactive stroma (Cunha et al., 2002). Stromal cells associated with tumor cells are able to remodel extracellular matrix, increase protease activity, and respond to androgens and growth factors, triggering proliferative processes, influx of inflammatory cells, migration, angiogenesis and tumor metastasis (Cunha et al., 2002; Cornell et al., 2003; da Silva et al., 2017). All of these processes will ensure greater proliferation and survival capacity for the tumor. Therefore, the simple occurrence of mutations is not sufficient to trigger the genesis of prostate cancer; it also requires a permissive microenvironment in which the transformed cells can progress to a malignant phenotype (Sprenger et al., 2008).

Taking into account the androgenic role in prostate development and the occurrence of lesions associated with hormonal imbalance, currently prostate cancer is treated with prostatectomy or androgen deprivation therapy, which is generally effective during the early stages of the disease (Leighton et al., 2018). However, tumor cells often acquire androgen resistance, becoming more aggressive, metastatic (especially to the bone) and resistant to other chemotherapeutic drugs (Wang et al., 2008), underscoring the need for the development of new therapies and chemopreventive strategies for prostate cancer.

Emerging evidence indicates that chronic inflammation plays an important role in prostate carcinogenesis (Kido et al., 2016). According to Wong et al. (2009), prostate epithelial cells may play a significant role in the recruitment, maintenance and amplification of the inflammatory process through the activation of important pro-inflammatory and survival transcription factors, such as NF-kB, and local production of pro-inflammatory cytokines. The recruitment of immune cells into the reactive stroma results in the release of additional pro-inflammatory factors, which contribute to genomic instability, proliferation, regulation, apoptosis and cell migration as well as invasion and angiogenesis (Culig and Puhr, 2012; Mimeault and Batra, 2013). Rodriguez and Gonzalez-Perez (2004) observed an inverse

correlation between the treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and development of prostate cancer. Kido et al., 2017 demonstrated that the control of the inflammatory process with the NSAID Celecoxib in the early stages of prostate cancer was determinant for the negative regulation of signaling pathways involved in proliferative processes in advanced stages of cancer. Therefore, a combination of anti-inflammatory and antiproliferative agents could be a promising alternative for the prevention and treatment of prostate cancer.

Natural products are a major source of effective drugs for cancer treatment and often inspire the development of new potential agents (Newman and Cragg, 2016). One such product is Propolis, a complex resinous mixture collected by bees that has been used in popular medicine since ancient times (Freires et al., 2016). Recently, it has become a subject of special interest in the field of cancer research as a source of valuable polyphenolic compounds that display immunomodulatory, anticancer and chemopreventive properties (Patel, 2016). Some of the suggested mechanisms in cancer cells involve suppression of proliferation, through the induction of cell cycle arrest and apoptosis (Szliszka and Krol 2011). Brazilian Red Propolis (BRP), collected from Alagoas State, northeast of Brazil, presents a unique chemical composition enriched in isoflavones (Franchin et al., 2016). Crude extracts and isolated molecules of BRP have been shown to be promising anti-inflammatory, antibacterial, antifungal and anticancer agents (Freires et al., 2016; Nani et al., 2017). In fact, our group demonstrated the *in vivo* anti-inflammatory and antitumor activities of the ethanolic extract from BRP, which is the major form of consumption of propolis in popular medicine (unpublished data).

Considering the anti-inflammatory and antiproliferative potentials of BRP, the study herein aimed to evaluate the activity of the ethanolic extract from BRP in the development of prostate cancer *in vivo* using the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. In this model, the prostates progress through different pre-neoplastic and neoplastic lesions supported by the inflammatory microenvironment, similar to what occurs in man, therefore representing an important model for the investigation of this type of cancer (Gingrich & Greenberg, 1996; Chiaverotti et al., 2008).

Here we show that treatments with the ethanolic extract from BRP exert antiproliferative activity *in vitro* in a concentration-dependent way, with induction of cell cycle arrest and cell death. *In vivo*, animals treated with BRP presented decreased prostate intraepithelial neoplasia, as a result of increased apoptosis, decreased proliferation and expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2), a major regulator of inflammation. Importantly, this is the first report of BRP effects on prostate cancer relating its mechanism and activity *in vitro* and *in vivo*.

# MATERIALS AND METHODS

#### BRP collection and preparation of the ethanolic extract

Brazilian Red Propolis samples were collected from boxes of *Apis mellifera*, located in Maceió, Alagoas State, northeast of Brazil (9°40′ S, 35°41′ W), at the end of summer. Identification and chemical characterization were performed in the Department of Agri-food Industry, Food and Nutrition, "Luiz de Queiroz" College of Agriculture, University of São Paulo (Piracicaba, São Paulo, Brazil) by Dr. Severino Matias de Alencar. Propolis was grounded to a fine powder and 20 g (dry weight) was mixed with 250 mL of 80% (v/v) ethanol and shaken at 70°C for 30 min. After extraction, the mixture was centrifuged, and the supernatant was evaporated under low pressure to produce the ethanolic extract of Brazilian red propolis (EERP) and it was characterized using the protocol established by Silva *et al.* (2008).

#### <u>In vivo assays</u>

#### Animals and treatments

Experiments were conducted using male TRAMP animals (C57BL/6-Tg (TRAMP) 8247Ng/JX FVB/Unib F1/J), obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animals Sciences (CEMIB) at the University of Campinas (UNICAMP). The animals (n=10) were treated orally, from 8 to 12 weeks of age, with either EERP (50 mg/kg, named TP12 group) or vehicle (PBS, 10 mL/kg, named TC12 group). EERP was emulsified in 1% Tween 80 (Sigma-Aldrich) and dissolved in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.0. The acute toxicity of EERP was evaluated previously (unpublished data).

TRAMP animals were euthanized at two different time points, at 8 weeks of age (T8) in order to establish the initial lesion grade when the treatments above had started and at 12 weeks of age (T12), when is possible to observe well-differentiated adenocarcinoma. Euthanasia was performed with 2% xylazine hydrochloride (5 mg/kg; Konig, São Paulo, Brazil) and 10% ketamine hydrochloride (60 mg/kg; Fort Dodge, IA). Animal care, research and animal sacrifice protocols were in accordance with the principles and guidelines adopted

by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Institute of Biology/UNICAMP - Ethical Committee for Animal Research (number 4178-1). Morphological Analysis

Ventral prostate samples from five animals/group were collected and fixed in Bouin's solution during 24 h. Then, the fixed tissues were dehydrated, diaphanized, and embedded in plastic polymers (Paraplast, Sigma-Aldrich). Histological sections of 5µm were obtained using a microtome (Zeiss Hyrax M60) and subsequently stained with hematoxylin and eosin (H.E.). The slides were photographed with a Nikon Eclipse E-400 photomicroscope (Nikon). For each sample, ten random fields were captured at 40X magnification, which were divided into four quadrants. Each quadrant was classified according to the method developed by Roy-Burman et al. (2004) in order to differentiate the degrees of prostatic lesions in each mouse: (1) normal tissue (NT); (2) low-grade prostatic intraepithelial neoplasia (LGPIN); (3) high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and (4) well-differentiated adenocarcinoma.

### Immunohistochemistry

Ventral prostate samples from five animals/group were processed in the same manner as described for the morphological assay. The COX-2 (1:50) and PCNA (1:250) antigens were detected using, respectively, mouse monoclonal anti-COX-2 (sc-376861; Santa Cruz Biotechnology) and mouse monoclonal anti-PCNA (ab-29; Abcam) according to the procedures in Montico et al. (2015) and Kido et al. (2016). After overnight incubation with primary antibody, the sections were incubated for 2 h with HRP-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit IgG (W4018; Promega). The peroxidase activity was detected using a 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich) and Harris' hematoxylin was used for counterstaining. The positive antibody reaction was identified by brown-stained DAB precipitate, and the immunohistochemical analyses were followed by a negative control in which the primary antibody was not used. The experiment was carried out using the multipoint system (Weibel, 1963 modified) with 710 (COX-2) and 850 (PCNA) intersection points. Ten random fields were captured at 40X magnification for each animal. COX-2 and PCNA-positive-cell quantification were determined by brown-stained nucleus count, coinciding with the grid intersection, divided by the total number of points. The result was expressed as the relative frequency of COX-2 or PCNA-positive cells in all experimental groups.

# Apoptosis detection

For apoptosis detection, ventral prostate samples from each experimental group (n=3) were collected and fixed in paraformaldehyde 4% for 12 hours. Tissue preparation and histological sections were obtained as described above. Fragmented DNA from apoptotic cells was detected using Dead-End<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL system (Promega, Madison, WI, EUA) following the manufacturer's protocol. For nuclear counterstaining, the sections were incubated with DAPI 0.5  $\mu$ g/mL for 15 minutes. The apoptotic nuclei were identified and photographed (10 fields per animal, totalizing 30 fields per experimental group) under inverted microscope Olympus IX71-II (Olympus, California, EUA) equipped with a fluorescence system (IX2-FL-II, Olympus, California, EUA). The images taken were analyzed using a multipoint system with 850 intersections (Weibel 1963, modified). The number of apoptotic cells was determined by the counting positive nucleus staining coinciding with the grade intersection divided by the total number of points coinciding with metal system expressed as relative frequency of positive staining in all experimental groups.

# Western blotting

Prostate ventral samples from five animals/group were collected and homogenized (Polytron homogenizer-Kinematica Inc.) with RIPA extraction buffer (Millipore, Temecula, CA) and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The tissue extracts were obtained by centrifuging the samples for 20 minutes (14,000 rpm at 4°C) and protein quantification was determined by spectrophotometry using the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A total of 40 µg protein was loaded onto a SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions and subjected to separation according to molecular weight by electrophoresis. Subsequently, the proteins were electrically transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA) at 120V for 90 min. The membranes were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) diluted in trisbuffered saline and Tween 20 (TBS-T) for 1 h and incubated overnight 4°C with the primary antibody (1:350) mouse monoclonal anti-COX-2 (sc-376861; Santa Cruz Biotechnology). After washes in TBS-T, the membranes were incubated for 2 h with secondary HRPconjugated anti-rabbit antibody in a dilution of 1:6000 in 3% BSA. To detect reactive bands, membranes were exposed to chemiluminescence solution (Super- SignalTM West Pico Chemiluminescent Substrate/ Pierce Biotechnology, Rockford, IL) for 5 min and captured using Gene Gnome equipment and the GeneSys image acquisition software (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK). The antibody for mouse monoclonal anti-beta-actin (sc-81178; Santa Cruz Biotechnology) was used as an endogenous control. The intensity of antigen bands was quantified by densitometry using the Image J (https://imagej.nih.gov/ij/; NIH) (Image Analysis and Processing in Java) software for image analyses and expressed in relation to the endogenous control band intensity.

#### In vitro assays

#### Cell culture and treatments

PC-3 cells (human prostate adenocarcinoma, adherent) provided by the National Cancer Institute (NCI-USA), were cultured in RPMI-1640 cell culture medium (Corning) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Atlanta Biologicals) and 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in air. For all experiments, the stock solution of EERP was prepared in DMSO and diluted in cell culture medium to the experimental concentrations, with final concentration of DMSO not toxic to the cells (0.1%).

## Proliferation assay

Cell proliferation assay was performed with alamarBlue® (ThermoFisher) according to the manufacturer's instruction. In this assay, metabolically active cells will reduce the active reagent of alamarBlue® resazurin to resorufin, which is highly fluorescent at 570nm. Therefore, fluorescence captured at 570nm is indicative of the amount of metabolically active ("healthy") cells that are present in the culture. Important to note, because the reagent labels metabolically active cells, one can only infer cell death and/or proliferation rates. For example, less fluorescence could be due to a cytostatic or citocidal effect, or simply alter cellular metabolism.

Briefly, PC-3 cells were seeded in 96 wells plate  $(4.5 \times 10^4 \text{ cells/mL})$  in 100 µL of complete medium and incubated for 24 h at 37 °C, 5% of CO<sub>2</sub> in air. After that, cells were treated with vehicle (0.1% DMSO) and 12.5, 25, 50 and 100 µg/mL of EERP for 24 and 48 h. To access proliferation, 20 µL of the 10X alamarBlue® solution was added per well. The plates were incubated for 4 h at 37 °C, 5% of CO<sub>2</sub> in air and afterwards the fluorescence was read in a fluorescence plate reader (Spark®, Tecan) at 570nm (excitation) and 585nm (emission).

In order to inhibit apoptosis or necroptosis, cells were pre-treated overnight with 25  $\mu$ M of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (R&D Systems) or 2  $\mu$ M of RIP kinase 3

inhibitor GSK'872 (Calbiochem/Millipore), respectively, both diluted in DMSO/complete media. After that, the medium containing the inhibitors was replaced by the treatments with 12.5, 25, 37.5 and 50  $\mu$ M of EERP in DMSO/complete media and the cells were incubated for 24 h at 37 °C, 5% of CO<sub>2</sub> in air. Proliferation was accessed with alamarBlue® as described above. All experiments were performed two or three times in triplicate. These experiments were conducted at Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA.

#### Cell death assay

In order to evaluate cell death, we used PC-3 cells expressing a red fluorophore mCherry (RFP), kindly provided by Dr. Ralph Francescone (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA). Briefly, RFP+ PC-3 cells were seeded in 24 wells plate  $(4.5x10^4 \text{ cells/mL})$  in 500 µL of complete medium and incubated for 24 h at 37 °C, 5% of CO<sub>2</sub>. After that, cells were treated with vehicle (0.1% DMSO) and 12.5, 25, 37.5 and 50 µg/mL of EERP for 24 h. To access cell death, after 24 h of treatment with EERP, cells were treated with 1 µM of Sytox® green nucleic acid stain (Invitrogen) for 20 minutes. Then, cells were imaged using a Cool Snap 1HQ camera (Roper Scientific, Vianen, Netherlands) on an Eclipse 2000-U inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan), with 10 images taken of red PC-3 cells and green dead cells per well, at 4X. Cell death was quantified as the total number of green cells (dead) divided by the total number of RFP+ cells/image, using Image J. The amount of death per image was normalized to the mean death of the control cells (vehicle). Sytox® green is a non-permeable stain, that only enters into cells that have compromised cell membranes, therefore staining dead cells.

Apoptosis and necroptosis were inhibited using the same protocol described above, following treatments with 12.5, 25, 37.5 and 50  $\mu$ g/mL of EERP for 24 h, staining with Sytox® green and imaging at 4X in the same conditions described above. These experiments were conducted at Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA.

# Cell Cycle and Phosphatidylserine externalization (PS)

Cell cycle analysis was performed with the Guava®Cell Cycle reagent (Guava Technologies, Hayward, CA) and PS was analyzed by flow cytometry using Guava® Nexin Assay Kit (Guava Technologies, Hayward, CA) both in accordance with the manufacturer's instructions. The human prostate cancer cell line (PC-3) was inoculated in a 6-well plate  $(5x10^4 \text{ cells/mL}, 2 \text{ mL/well})$  and incubated for 24 h at 37 °C, 5% of CO<sub>2</sub>. For cell cycle analysis, cells were deprived of serum for 24 h for cell cycle synchronization, and then treated
with EERP (10 and 25  $\mu$ M) and colchicine (Sigma-Aldrich, 1 nM) in DMSO/RPMI, for 24 h. Concentrations were chosen based on the results found in the viability assay. After treatment, cells were harvested and re-suspended at a density of 1 x 10<sup>5</sup> cells in 100  $\mu$ L of PBS. The binding buffer containing propidium iodide (PI) was added to the cells and the suspension was incubated in the dark for 20 min at room temperature. Then, the cells were analyzed by a flow cytometer (Guava Easycyte Mini-Guava Technologies, Hayward, CA). The distribution of cells in the different phases of the cell cycle was expressed in percentage (%).

For phosphatidylserine externalization, PC-3 cells were treated with EERP (25 and 50  $\mu$ M) in DMSO/RPMI for 24 h, harvested and resuspended at a density of 1x10<sup>5</sup> cells in 100 mL of supplemented medium. The binding buffer containing annexin-V and 7-AAD (100  $\mu$ L) was added on the cells and incubated in the dark for 20 min at room temperature.

Finally, for both assays, the cells were analyzed (triplicates for each complex concentration; 5.000 events per replicate) by flow cytometry (Guava EasyCyte Mini Flow Cytometry System, Millipore®, Billerica, MA, USA flow cytometer).

#### Statistical analysis

The experimental results were expressed as the mean standard error (SE) and by analysis of variance (ANOVA), one-way and two-way, followed by Tukey or Bonferroni tests, respectively. P values lower than 0.05 (p < 0.05) were considered as indicative of significance and represented by: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001. The calculations were performed using the statistical software Graph- Pad Prism version 5.0, San Diego California, USA.

#### RESULTS

EERP delays the progression of prostate adenocarcinoma in TRAMP mice

The lesions were characterized as acinar epithelium proliferative lesions with different grades of severity. The most frequent neoplastic lesion observed in the ventral prostate lobe of TRAMP animals at 8 weeks old was low-grade prostatic intraepithelial neoplasia (LGPIN), characterized by cellular atypia and uncontrolled epithelial cells proliferation (Figure 1A); to a greater degree, the proliferation starts to occupy the acinar lumen, presenting acini with a cribriform feature, characteristic of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) lesions, which are significantly increased in 12 week old animals (Figure 1A and 1B). Furthermore, 12 week old group displayed a significant increase in epithelial cell proliferation

(PCNA staining), reflecting the decreased normal acini frequency observed when compared to 8 weeks of age (Figure 1A, 1E-F).

Previously, BRP had been shown to reduce cellular proliferation of cancer cells in a number of *in vitro* models (Novak et al., 2014; Machado et al., 2016). Thus, to test the efficacy of EERP on transformed cells *in vivo*, we treated 8 week old mice with EERP for 4 weeks. Importantly, a significantly higher frequency of normal acini was observed in EERP treated animals when compared to the same aged control animals (Figure 1A and 1D), pointing out a delayed progression of adenocarcinoma development in the animals treated with EERP. Moreover, this group presented epithelial atrophy in comparison to the control group (TC12), indicative of the antiproliferative effect of EERP. Furthermore, a significantly decreased frequency of HGPIN was observed in the same group of animals. Corroborating the histopathological analyses, a significant reduction of epithelial cell proliferation was observed in the group treated with EERP compared to the respective control group (Figure 1E and 1H).



Figure 1. *EERP cause delay of neoplastic lesions in the ventral prostate of TRAMP mice by inhibiting epithelial tumor cell proliferation* A: Frequency of normal area and different grades of lesions in the prostate of TRAMP animals. B: T8 group, showing epithelial cell proliferation with a predominance of LGPIN (arrow). C: T12 group displays prostatic epithelium stratification in a cribriform pattern (Cr) that occupies the acinus lumen, due to increased cellular proliferation at this stage, characterizing HGPIN D: TEERP group showing increased frequency of normal acini, with marked presence of atrophied epithelial cells. F: Representative image of the T8 group. G: Representative image of the TC12 group. H: Representative image of the TEERP group. PCNA-positive staining is indicated by an arrow in the nucleus. Harris Hematoxylin was used as a counterstain. Asterisks indicate a significant difference between TEERP and TC12 group and different letters indicate a significant difference amongst control groups (TC8 and TC12). Values are expressed as mean + S.E.M. of five animals (ANOVA followed by Tukey's test) \*p<0.05 \*\*p<0.01. Ep = epithelium; St = stroma; L = lumen; Cr = cribriform acinus. (B, C, D, F, G and H: 400x, Scale bar = 100 µm).

To determine the effect of EERP on tumor cell inflammatory profile, COX-2 was stained in the ventral prostate lobes of 8 week old, 12 week old, and 12 week old EERP treated TRAMP mice. A significant increase in COX-2 immunoreactivity was observed in 12 week old animals compared to 8 week old animals, which was evident in the immunohistochemistry and western blotting analysis (Figure 2A-C). Likewise, there was a significant decrease in COX-2 immunoreactivity after EERP treatment compared to the same aged animals (Figure 2A and 2D). Apoptosis analyses showed that EERP treatment was able to significantly increase epithelial apoptotic cells in the ventral prostate of TRAMP animals (Figure 3A-D). Taken together, treatments with EERP for 4 weeks delayed the progression of prostate carcinogenesis, by inhibiting epithelial cell proliferation and increasing their death. Also, the reduction on COX-2 expression by epithelial cells indicates a decreased inflammatory process that ultimately would contribute to cell proliferation and survival.



Figure 2. *EERP treatment significantly decreased the imunoreactivity of COX-2 in the ventral prostate epithelium of TRAMP mice*. A: Quantification of COX-2 immunoreactivity in epithelial cells. B: Representative image of the T8 group. C: Representative image of the TC12 group. D: Representative image of the TEERP group. COX-2 epithelial staining is indicated by an arrow. Harris Hematoxylin was used as a counterstain. 400x, scale bar = 100µm. Asterisks indicate a significant difference between TEERP and TC12 group and different letters indicate a significant difference amongst control groups (TC8 and TC12). Values expressed as media + S.E.M. of five animals (ANOVA followed by Tukey's test) \*\*p<0.01. Ep = epithelium; St = stroma; L = lumen. E: COX-2 expression in all three experimental groups by Western Blotting. Densitometric assessments are reported as mean values relative to β-actin band intensity, normalized to the T12 group (ANOVA followed by Tukey's test).



Figure 3. *EERP induces apoptosis in epithelial cells in the ventral prostate of TRAMP mice.* A: Quantification of apoptotic epithelial cells as determined by TUNEL staining. B: Representative image of the T8 group. C: Representative image of the TC12 group. D: Representative image of the TEERP group. 400x, scale bar = 100µm. Asterisks indicate a significant difference between TEERP and TC12 group and different letters indicate a significant difference amongst control groups (TC8 and TC12). Values expressed as mean + S.E.M. of tree animals (ANOVA followed by Tukey's test) \*\*\*p<0.001. Apoptotic cells are indicated by an arrow. Ep: epithelium, St: stroma, L: lumen. Nuclei were stained with DAPI.

## EERP induces cell death in PC-3 cells *in vitro* Effects on proliferation and cell death

In order to better understand the effects of EERP on prostate cancer cell viability, we evaluated the antiproliferative and citocidal effects in a human prostate adenocarcinoma (PC-3). EERP exerted a concentration-dependent effect in PC-3 cells; treatments with 12.5  $\mu$ g/mL for 24 (Figure 4A) and 48 hours (Figure 4B) were not effective in promoting an antiproliferative effect. The 25  $\mu$ g/mL concentration inhibited cell proliferation by 5.9 and 21.4% after 24 and 48 hours of treatments respectively (Figure 4A). On the other hand, treatments with 50 and 100  $\mu$ g/mL of EERP exerted a potent effect was even more impressive after 48 hours of treatments, where proliferation was inhibited by 66.0 and 93.2% in response to treatments with 50 and 100  $\mu$ g/mL of EERP respectively (Figure 4B). The morphological aspect of PC-3 cells treated with different concentrations of EERP for 48 hours are showed in Figure 4C.



EERP 50ug/mL

EERP 100ug/mL

Figure 4. Antiproliferative effects of EERP in human prostate adenocarcinoma cells. Human prostate adenocarcinoma cells (PC-3) were treated with control (0.1% DMSO) and different concentrations of EERP (12.5, 25, 50 and 100 ug/mL) for A: 24 and B: 48 hours. Cell proliferation was assessed by the alamar Blue assay. Fluorescence was measured at 585nm, which was an indicative of the amount of metabolically active cells. Results are represented as percentage of cell growth. Values are expressed as mean + S.E.M (ANOVA followed by Tukey's test), \*\*\*\* p <0.0001. Experiments were performed two times in triplicate. C: Representative bright field photomicrographs of PC-3 cells treated with control and increasing concentrations of EERP (12.5, 25, 50 and 100 ug/mL) for 48h (10X, Scale bar = 100µm). Because the alamarBlue® method measures cells that are metabolically compromised, which does not mean that cells are dead, but instead could be quiescent (due to a cytostatic effect) or proliferating less, we decided to evaluate the effects of EERP on cell death by measuring cells with loss of cell membrane integrity, indicative of advanced cell death or presence of cell debris. Therefore, we chose to treat the cells with 12.5, 25, 37.5 and 50  $\mu$ g/mL of EERP for 24 hours. Compared to control cells (vehicle), treatments with 25, 37.5 and 50  $\mu$ g/mL were able to significantly induce cell death, promoting an increase of 3.5, 6.4 and 9.1 fold in cell death frequency (Figure 5A-B). Overall, these results demonstrate that EERP reduces the metabolic activity of PC-3 cells, with a concomitant increase of cell death, suggesting that EERP can induce cell death at higher concentrations.



37.5 µg/mL

 $50 \,\mu g/mL$ 



**EERP 24 hours** 

в

**Figure 5**. *EERP induces cell death in human prostate adenocarcinoma cells*. Human prostate adenocarcinoma cells (PC-3) expressing mCherry (RFP) were treated with control (0.1% DMSO) and different concentrations of EERP (12.5, 25, 50 and 100 ug/mL) for 24 h. Dead cells were labeled with Sytox green nucleic acid stain. **A:** Cells were imaged using a Cool Snap 1HQ camera on an Eclipse 2000-U inverted microscope, with 10 images taken of red PC-3 cells and green dead cells per well, at 4X. **B:** Cell death was quantified as the total number of green cells (dead) divided by the total number of RFP+ cells/image, using Image J. Values are expressed as mean cell death + S.E.M, normalized to control (ANOVA followed by Tukey's test), \* p<0.05, \*\*\*\* p <0.0001.

## Effects on PC-3 Cell Cycle

In order to further dissect between cytostatic effects and cell death, we evaluated the effects of EERP on the cell cycle and on the externalization of phosphatidylserine combined with loss of cell membrane integrity, an indicative of apoptotic cell death.

EERP at the lowest concentration (10  $\mu$ g/mL) promoted an arrest in G1 phase of cell cycle with a subsequent decrease in the subpopulations of S and G2/M, at 24 hours (Table 1). Cells treated with 25  $\mu$ g/mL of EERP promoted a decrease in the subpopulation of cells in G1 phase with a slight arrest in of cells in the phase S (Table 1). As expected, the positive control colchicine promoted arrest in G2/M phase of the cell cycle (Table 1). These results indicate that EERP promotes cell cycle arrest, likely inducing a cytostatic effect prior to cell death. This could explain the decreased reduction of the alamarBlue® reagent in the experiments described above (Figures 4A and B).

**Table 1.** Percentage of PC-3 cells in different stages of cell cycle after 24 hours of treatment with ethanolic extract of Brazilian Red Propolis (EERP).

	Phases			
Treatments	<b>G1</b>	S	G2/M	
Vehicle	$49.07 \pm 1.00$	$15.54 \pm 0.91$	$35.38 \pm 1.06$	
EERP 10µg/mL	57.66 ± 1.64***	11.81 ± 0.56**	30.53 ± 1.56**	
EERP 25µg/mL	$43.79 \pm 1.48^{**}$	$18.03 \pm 1.46*$	$38.17 \pm 2.02$	
Colchicine 1.25nM	27.01 ± 2.51***	$13.10 \pm 1.86$	$56.66 \pm 4.55^{***}$	

Values expressed as mean + SEM (Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). \*p < 0.05 \*\*p < 0.01\*\*\*p < 0.001 compared to vehicle from two different experiments in triplicate. Vehicle: 0.25% DMSO (diluent). Phases: Gap phase 1 (G1); DNA synthesis (S); Gap phase 2 (G2), during which the cell prepares itself for division; and mitosis (M).

#### Effects on PC-3 phosphatidylserine externalization and loss of cell membrane integrity

Treatments with 25 and 50  $\mu$ g/mL of EERP for 24 hours were sufficient to induce cell death, demonstrated by the increase in cells exposing phosphatidylserine residues (annexin(+), 7-AAD(-)), with a 20 fold increase after treatment with the lowest concentration and 50 fold increase with the highest concentration (Table 2). These features are representative of early stages of death. The percentage of double-positive cells (annexin(+), 7-AAD (-)) was also increased after treatments with both concentrations of EERP, with a two fold increase after exposure to 25  $\mu$ g/mL, while the exposure to 50  $\mu$ g/mL of EERP increased same population by 10 fold (Table 2). These data indicate that EERP induces cell death in a concentration-dependent manner, with the majority of the cells in early stages of cell death at 24 hours, transitioning to late stages of cell death when there is a loss of cell membrane

integrity. These results are in accordance with the alamarBlue<sup>®</sup> and Sytox<sup>®</sup> green assays (figures 4 and 5), where the lower concentrations (10 and 12.5  $\mu$ g/mL) did not have a dramatic effect on cell metabolism (growth), but cells began to show of commitment to cell death. On the other hand, the higher concentration (25  $\mu$ g/mL) reduced the metabolic activity and increased the cell death of PC-3 cells, with a similar shift observed with the cell cycle and annexin V analyses. Taken together, EERP is likely cytostatic at lower concentrations and cytotoxic at higher concentrations.

**Table 2.** Percentage of PC-3 cells exposing phosphatidylserine residues and with loss of cell membrane integrity after 24 hours of treatment with the ethanolic extract of Brazilian Red Propolis (EERP).

	Treatments		
	Vehicle	<b>ΕΕRP 25</b> μg/mL	<b>ΕΕRΡ 50</b> μg/mL
Annexin(-) 7-AAD(-)	$90.63 \pm 2.08$	$71.75 \pm 0.66^{***}$	$27.43 \pm 0.80^{***}$
Annexin(+) 7-AAD(-)	$0.87 \pm 0.34$	18.10 ± 1.59***	$46.65 \pm 0.91^{***}$
Annexin(+) 7-AAD(+)	$2.52 \pm 0.73$	$5.65 \pm 0.25^{**}$	$22.38 \pm 0.89^{***}$
Annexin(-) 7-AAD(+)	$5.95 \pm 1.48$	$4.52 \pm 1.09$	$3.57 \pm 0.97$

Values expressed as mean + SEM (Two-Way ANOVA, followed by Bonferroni post-test). \*p < 0.05 \*\*p < 0.01\*\*\*p < 0.001 compared to vehicle from two different experiments in triplicate. Vehicle: 0,25% DMSO (diluent).

Apoptosis and necroptosis inhibitors have a minimal effect on EERP induced cell death

In order to further explore the effects of EERP in PC-3 cells, we questioned if inhibition of caspases could revert the antiproliferative and cytotoxic effects of EERP. The assessment of caspases influence is important because together with PS externalization and loss of cell membrane integrity, it characterizes apoptotic cell death. To this end, we pretreated the cells with a pan caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) and accessed cell proliferation and death after 24 hours of treatment with EERP (Figure 6). The effects of Z-VAD treatment were more evident in the cells treated with 25  $\mu$ g/mL of EERP, where Z-VAD pre-treatment reverted the antiproliferative effects of EERP by 18% and this group was no longer statistically different from the control group (Figure 6A). When assessing cell death after pre-treatment with the inhibitor, there was a tendency for decreased cell death in the cells pre-treated with Z-VAD in the groups treated with 37.5 and 50  $\mu$ g/mL of EERP, when there was a decrease of 6.8% and 15.8% in cell death respectively compared to cells treated with EERP alone (Figure 6C). These results show that inhibition of caspases activity was not enough to revert the effects of EERP in cell proliferation and death, suggesting that apoptosis is not the only mechanism of death induced by EERP.

In order to evaluate if necroptosis is involved in the cell death induced by EERP, we pre-treated the cells with the RIPK3 inhibitor GSK'872. Similarly to what happened after caspases inhibition, pre-treatment with GSK'872 was able to revert the antiproliferative effects induced by 25  $\mu$ g/mL of EERP by 22% (Figure 6B). Moreover, GSK'872 was able to revert cell death induced by 37.5  $\mu$ g/mL of EERP by 27%, with a tendency for reverting the effect of the treatment with 25  $\mu$ g/mL of EERP by 17% (Figure 6D). Together, these results suggest that pre-treatments with the inhibitors did not completely reverse the effects of EERP, suggesting a combination of different types of cell death induced by EERP in PC-3 cells.

## Alamarblue



Figure 6. Apoptosis and necroptosis inhibition does not significantly alter EERP antiproliferative and cytotoxic activities in human prostate adenocarcinoma cells. Human prostate adenocarcinoma cells (PC-3) or RFP+ PC-3 cells were pre-treated with A, C: pancaspase inhibitor Z-VAD-FMK and B, D: RIP kinase 3 inhibitor GSK'872 overnight, followed by treatments with control (0.1% DMSO) and different concentrations of EERP (12.5, 25, 50 and 100 ug/mL) for 24 h A, B: Proliferation was accessed with cell proliferation. Results are represented as percentage of cell growth. Values are expressed as mean + S.E.M C,D: Dead cells were labeled with cell death nucleic acid stain. Cell death was quantified as the total number of green cells (dead) divided by the total number of RFP+ cells/image, using Image J. Values are expressed as mean cell death + S.E.M, normalized to control (ANOVA followed by Tukey's test), \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001.

#### DISCUSSION

Prostate cancer has been widely studied because of the high incidence among men, presenting alarming statistics of 165,000 new cases and 29,500 deaths in 2018, in the United States alone (Siegel et al., 2018). Although prostate cancer has been detectable in the early stages of the disease (non-palpable disease) due to annual screenings in men (Buyyounouski et al., 2017), it often becomes resistant to anti-androgens and chemotherapeutic drugs (Galleti et al., 2017). As a consequence, this tumor becomes more aggressive, displaying features that contribute to metastasis (Galleti et al., 2017). Therefore, it is essential for the development of new therapeutic strategies. Natural products, which have evolutionarily optimized biological properties, offer a broad source of potent and unique anticancer compounds that can target multiple cellular mechanisms (Cragg et al., 2014; Salim et al., 2015).

In this study we showed that the ethanolic extract from BRP (EERP), a natural product widely used popularly for its medicinal benefits, inhibited the progression of prostate adenocarcinoma in TRAMP mice, evidenced by the lower frequency of HGPIN, higher frequency of normal acini, significant reduction of epithelial cells proliferation and reduction in COX-2 expression by these cells, providing a less aggressive tumor environment and less support for tumor development. *In vitro* studies with human prostate adenocarcinoma cells (PC-3) confirmed the *in vivo* results, as EERP was able to inhibit cell proliferation through the induction of cell cycle arrest in the G1 phase and evoked different types of cell death, including apoptosis.

The present study is the first to demonstrate the *in vitro* and *in vivo* effects of EERP on cell proliferation, apoptosis, cell cycle regulation and inhibition of tumor growth in a prostate cancer model. Although some *in vitro* studies have demonstrated the mechanisms of action of different types of propolis and their constituents in prostate cancer cells, more research is needed to understand how they exert their antitumor effects (Szliszka et al 2011). Li *et al.* (2007) showed that the ethanolic extracts from two different types of Brazilian Propolis (green propolis and group 3) have a significant inhibitory effect on the proliferation of human prostate cancer cells (DU145 and PC-3) and primary malignant prostate tumor (RC58T / h / SA # 4) *in vitro*. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a bioactive component extracted from propolis, suppresses the proliferation of human prostate cancer cells (LNCaP, DU-145 and PC-3), (Chuu et al. 2012, Lin et al. 2012), corroborating the antiproliferative activity found in this study.

Acute and chronic inflammatory processes are commonly found in the prostate of adult men and are known to be linked to all prostatic diseases, including prostate cancer (Sfanos et al., 2018). Therefore, many of the studies seeking new alternatives for prostate cancer prevention and containment of prostatic lesions are focusing on the use of inflammation-controlling agents, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Rodriguez & Gonzalez-Perez, 2004; Kido et al., 2017). Among the various types of NSAIDs, selective COX-2 inhibitors have be highlighted because this enzyme is overexpressed in inflammatory processes and in the tumor environment of different types of tumors, including prostate (Garg et al., 2018; Silva et al., 2018). Selective COX-2 inhibitors, such as celecoxib, act by blocking the synthesis of prostaglandins, inhibiting the activation of NF-kB, and subsequently limiting the phosphorylation of the pro-survival factor Akt, leading to apoptosis in prostate cancer cells (Narayanan et al.2006; Hsu et al., 2000). Results from our research group demonstrated that treatments with celecoxib were effective in regulate COX-2 expression, leading to inhibition of tumor development in TRAMP mice (Kido et al., 2016, Silva et al., 2018) and inhibition of prostate carcinogenesis of senile animals (Kido et al., 2017). Interestingly, treatment with EERP also prevented the upregulation of COX-2 in the ventral lobe of prostates from TRAMP mice, suggesting that by exerting an anti-inflammatory effect, EERP could prevent the development of prostate cancer. This result correlates with the previous findings by our group concerning the anti-inflammatory effects of EERP in several in vivo models of inflammation (unpublished data).

Besides the inhibition of COX-2 expression, EERP treatments also showed antiproliferative (decreased PCNA expression) and pro-apoptotic (increased TUNEL positive cells) effects in TRAMP mice. Therefore, we decided to conduct *in vitro* studies to better understand the antiproliferative and cytotoxic properties of EERP, using the human prostate adenocarcinoma cell line PC-3. Our results show that EERP exerted a concentration-dependent effect on PC-3 cells proliferation. Treatments for 24 hours with smaller concentrations of EERP induced G1 arrest and a slight arrest in the S phase, therefore promoting a cytostatic effect.

Deregulated cell proliferation is a hallmark of cancer. Thus, disturbances in cell cycle regulation and the failure of quality control checkpoints play a key role in tumorigenesis (Meeran and Katiyar, 2008). G1 phase arrest prevents replication of damaged DNA; progression through this phase is mainly controlled by two critical tumor suppressor pathways, governed by p53 and pRb (Sherr and Roberts, 1999). The S-phase checkpoint avoids duplication of damaged or broken DNA, which would be propagated during mitosis,

increasing the risk for genomic instability, another hallmark of cancer (Meeran and Katiyar, 2008; Hanahan and Weinberg, 2011). Therefore, treatments that impede cancer cells to progress into mitosis are effective, as exhibited by many well-known antitumor drugs, such as topoisomerase inhibitors, antimetabolites, antitumor antibiotics, alkylating agents, among others. Studies have shown that a fraction of BRP caused arrest in G1 phase in B16F10 melanoma cells (Novak et al, 2014), which is in accordance with our findings in the *in vitro* and *in vivo* models.

Our studies indicate that EERP induces cell death in a concentration-dependent way, with the majority of the cells in early stages of cell death at 24 hours, but transitioning to late stages of cell death, when there is loss of cell membrane integrity. During some initial programmed cell death processes, including apoptosis, phosphatidylserine (PS), originally located on the internal phospholipid bilayer surface, is flipped to the external cell membrane surface (Galluzzi et al., 2012). The externalized molecules become available to bind Annexin V, and when cells become labeled, they are in the process of death. 7-amino-actinomycin D (7-AAD) binds to the cell's DNA after loss of cell membrane integrity, becoming an indicator of membrane structure integrity (Longato et al., 2015). Therefore, cells which are only stained with Annexin V-PE could be considered as being in the early stage of cell death, whereas those double-stained shows more advanced stages of the cell death process. Therefore, the presence of these characteristics suggests the induction of death by apoptosis; however, there may be other types of cell death.

The induction of apoptosis is one of the mechanisms proposed for the anticancer effects of propolis (Szliszka and Krol 2013). Studies have shown that different types of propolis have the capacity to initiate apoptosis through the intrinsic and extrinsic pathways (Begnini et al., 2014). Kamiya et al. (2012) demonstrated that the ethanolic extract of BRP induces apoptosis in MCF-7 cells (breast adenocarcinoma), a mechanism involving endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction, and induction of caspase-3 activity and DNA fragmentation. CAPE has been described as an effective inducer of apoptosis in PC-3 prostate cancer cells (Drago et al., 2013). Begnini et al. (2014) analyzed the effects of BRP in the induction of apoptosis and in the migration of bladder cancer cells, concluding that the mechanism of death in this type of cancer is associated with the activation of the intrinsic apoptosis pathway.

Because the externalization of phosphatidylserine combined with loss of cell membrane integrity are not exclusive features of apoptosis, we decided to evaluate the involvement of caspases in the EERP-induced cell death, as the combination of phosphatidylserine externalization, loss of cell membrane integrity and caspase activation indicate apoptotic cell death. For that, we pre-inhibited caspase activity using the pan caspase inhibitor Z-VAD. There was a tendency for decreased cell death in the cells pre-treated with Z-VAD, especially at smaller concentrations, but this inhibitor was not capable to completely ablate cell death, indicating that EERP induces multiple mechanisms of cell death, and apoptosis is one of them.

We next investigated the possible induction of necroptosis, as a complementary mechanism for EERP-induced cell death. Necroptosis is stimulated by perturbations of the environment that can be sensed by death receptors localized in the cell surface. In this type of cell death, caspases are inhibited; therefore the downstream activation of these death receptors activates receptor-interacting protein kinases (RIPK), first RIPK1, which activates RIPK3. This kinase controls a cascade of phosphorylation that ultimately results in plasma membrane permeabilization in the late stage of necroptosis (Galluzi et al., 2018). Importantly, because necroptosis occurs in the absence of caspase activation, caspase inhibitors do not inhibit this process. The pre-treatment with the RIPK3 inhibitor GSK'872 only partially prevented EERP-induced cell death, indicating that necroptosis could be a partial mechanism of death induced by EERP, together with apoptosis in PC-3 cells. Further experiments need to be development in order to confirm these hypotheses.

Apoptosis was considered one of the main strategies for inducing cancer cell death and treating patients. However, it has become increasingly clear that death can be triggered in cancer cells by different pathways, which could avoid resistance and could moreover stimulate other antitumor responses within the tumor microenvironment, such as cytotoxic immune response (Galluzzi et al., 2012; Krysko et al., 2017). EERP was able to induce different cell death pathways, highlighting a potential strategy for new therapeutic approaches. This is important because one of the hallmarks of cancer is resistance to cell death (Hanahan and Weinberg, 2011). Therefore, a therapy targeting multiple factors in the tumor microenvironment and within cancer cells is an attractive option.

Herein we show by multiple ways that EERP prevents prostate tumor progression, by inhibiting inflammation, proliferation and inducing cell death, becoming a potential alternative to be used in combinatory therapies. Moreover, its multi-target potential (anti-inflammatory, induction of different types of cell death) is an important feature that could overcome drug resistance and evasion mechanisms. In addition, it is important to note that this is the first report of the activity of BRP in a spontaneous model of cancer, using the popular form of BRP consumption, which is the ethanolic extract.

#### REFERENCES

Awale, S., Li, F., Onozuka, H., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. Bioorganic & medicinal chemistry 16(1), 181-189.

Begnini, K.R., Moura de Leon, P.M., Thurow, H., Schultze, E., Campos, V.F., Martins Rodrigues, F., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Savegnago, L., Roesch-Ely, M., Moura, S., Padilha, F.F., Collares, T., Pegas Henriques, J.A., Seixas, F.K., 2014. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM 2014, 639856.

Buyyounouski, M.K., Choyke, P.L., McKenney, J.K., Sartor, O., Sandler, H.M., Amin, M.B., Kattan, M.W., Lin, D.W., 2017. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA: a cancer journal for clinicians 67(3), 245-253.

Chen, H., Ewing, C.M., Zheng, S., Grindedaal, E.M., Cooney, K.A., Wiley, K., Djurovic, S., Andreassen, O.A., Axcrona, K., Mills, I.G., Xu, J., Maehle, L., Fossa, S.D., Isaacs, W.B., 2018. Genetic factors influencing prostate cancer risk in Norwegian men. The Prostate 78(3), 186-192.

Chiaverotti, T., Couto, S.S., Donjacour, A., Mao, J.H., Nagase, H., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., Balmain, A., 2008. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. The American journal of pathology 172(1), 236-246.

Chuu, C.P., Lin, H.P., Ciaccio, M.F., Kokontis, J.M., Hause, R.J., Jr., Hiipakka, R.A., Liao, S., Jones, R.B., 2012. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. Cancer prevention research 5(5), 788-797.

Cornell, R.J., Rowley, D., Wheeler, T., Ali, N., Ayala, G., 2003. Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma. Urology 61(4), 870-875.

Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., 2014. New horizons for old drugs and drug leads. Journal of natural products 77(3), 703-723.

Culig, Z., Puhr, M., 2012. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. Molecular and cellular endocrinology 360(1-2), 52-58.

Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. Differentiation; research in biological diversity 70(9-10), 473-485.

da Silva, R.F., Nogueira-Pangrazi, E., Kido, L.A., Montico, F., Arana, S., Kumar, D., Raina, K., Agarwal, R., Cagnon, V.H.A., 2017. Nintedanib antiangiogenic inhibitor effectiveness in delaying adenocarcinoma progression in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP). Journal of biomedical science 24(1), 31.

Drago, E., Bordonaro, M., Lee, S., Atamna, W., Lazarova, D.L., 2013. Propolis augments apoptosis induced by butyrate via targeting cell survival pathways. PloS one 8(9), e73151.

Franchin, M., Colon, D.F., Castanheira, F.V., da Cunha, M.G., Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Cunha, T.M., Rosalen, P.L., 2016. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. Journal of natural products 79(4), 954-960.

Freires, I.A., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2016. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. European journal of medicinal chemistry 110, 267-279.

Galletti, G., Leach, B.I., Lam, L., Tagawa, S.T., 2017. Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. Cancer treatment reviews 57, 16-27.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., Garcia-Saez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jaattela, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., Lopez-Otin, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.C., Martin, S.J., Martinou, J.C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Munoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nunez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell death and differentiation 25(3), 486-541.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer,

G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell death and differentiation 19(1), 107-120.

Garcia Rodriguez, L.A., Gonzalez-Perez, A., 2004. Inverse association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 13(4), 649-653.

Garg, R., Blando, J.M., Perez, C.J., Lal, P., Feldman, M.D., Smyth, E.M., Ricciotti, E., Grosser, T., Benavides, F., Kazanietz, M.G., 2018. COX-2 mediates pro-tumorigenic effects of PKCepsilon in prostate cancer. Oncogene.

Gingrich, J.R., Greenberg, N.M., 1996. A transgenic mouse prostate cancer model. Toxicologic pathology 24(4), 502-504.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144(5), 646-674.

Hsu, A.L., Ching, T.T., Wang, D.S., Song, X., Rangnekar, V.M., Chen, C.S., 2000. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. The Journal of biological chemistry 275(15), 11397-11403.

Kamiya, T., Nishihara, H., Hara, H., Adachi, T., 2012. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. Journal of agricultural and food chemistry 60(44), 11065-11070.

Kido, L.A., Montico, F., Sauce, R., Macedo, A.B., Minatel, E., Costa, D.B., Carvalho, J.E., Pilli, R.A., Cagnon, V.H., 2016. Anti-inflammatory therapies in TRAMP mice: delay in PCa progression. Endocrine-related cancer 23(4), 235-250.

Kido, L.A., Montico, F., Vendramini-Costa, D.B., Pilli, R.A., Cagnon, V.H.A., 2017. Goniothalamin and Celecoxib Effects During Aging: Targeting Pro-Inflammatory Mediators in Chemoprevention of Prostatic Disorders. The Prostate 77(8), 838-848.

Krysko, O., Aaes, T.L., Kagan, V.E., D'Herde, K., Bachert, C., Leybaert, L., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., 2017. Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. Immunological reviews 280(1), 207-219.

Leighton, X., Bera, A., Eidelman, O., Eklund, M., Puthillathu, N., Pollard, H.B., Srivastava, M., 2018. High ANXA7 Potentiates Eucalyptol Toxicity in Hormone-refractory Prostate Cancer. Anticancer research 38(7), 3831-3842.

Lin, H.P., Jiang, S.S., Chuu, C.P., 2012. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. PloS one 7(2), e31286.

Longato, G.B., Fiorito, G.F., Vendramini-Costa, D.B., de Oliveira Sousa, I.M., Tinti, S.V., Ruiz, A.L., de Almeida, S.M., Padilha, R.J., Foglio, M.A., de Carvalho, J.E., 2015. Different cell death responses induced by eupomatenoid-5 in MCF-7 and 786-0 tumor cell lines. Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA 29(5), 1026-1033.

Machado, B.A., Silva, R.P., Barreto Gde, A., Costa, S.S., Silva, D.F., Brandao, H.N., Rocha, J.L., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Umsza-Guez, M.A., Padilha, F.F., 2016. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. PloS one 11(1), e0145954.

Meeran, S.M., Katiyar, S.K., 2008. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 13, 2191-2202.

Mimeault, M., Batra, S.K., 2013. Development of animal models underlining mechanistic connections between prostate inflammation and cancer. World journal of clinical oncology 4(1), 4-13.

Montico, F., Kido, L.A., Hetzl, A.C., Cagnon, V.H., 2015. Prostatic angiogenic responses in late life: antiangiogenic therapy influences and relation with the glandular microenvironment in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. The Prostate 75(5), 484-499.

Nani, B.D., Franchin, M., Lazarini, J.G., Freires, I.A., da Cunha, M.G., Bueno-Silva, B., de Alencar, S.M., Murata, R.M., Rosalen, P.L., 2018. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. Phytotherapy research : PTR 32(4), 750-754.

Narayanan, B.A., Narayanan, N.K., Pttman, B., Reddy, B.S., 2006. Adenocarcina of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. The Prostate 66(3), 257-265.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of natural products 79(3), 629-661.

Novak, E.M., Silva, M.S.E.C., Marcucci, M.C., Sawaya, A.C.H.F., Lopez, B.G.C., Fortes, M.A.H.Z., Giorgi, R.R., Marumo, K.T., Rodrigues, R.F., Maria, D.A., 2014. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. J Funct Foods 11, 91-102.

Patel, S., 2016. Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. Journal of dietary supplements 13(3), 245-268.

Roy-Burman, P., Wu, H., Powell, W.C., Hagenkord, J., Cohen, M.B., 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. Endocrine-related cancer 11(2), 225-254.

Salim, E.I., Abd El-Magid, A.D., Farara, K.M., Maria, D.S., 2015. Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis Against the PC3 Prostate Cancer Cell Line. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP 16(17), 7641-7651.

Sfanos, K.S., Yegnasubramanian, S., Nelson, W.G., De Marzo, A.M., 2018. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. Nature reviews. Urology 15(1), 11-24.

Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes & development 13(12), 1501-1512.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2018. Cancer statistics, 2018. CA: a cancer journal for clinicians 68(1), 7-30.

Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 5(3), 313-316.

Silva, R.S., Kido, L.A., Montico, F., Vendramini-Costa, D.B., Pilli, R.A., Cagnon, V.H.A., 2018. Steroidal hormone and morphological responses in the prostate anterior lobe in different cancer grades after Celecoxib and Goniothalamin treatments in TRAMP mice. Cell biology international 42(8), 1006-1020.

Sprenger, C.C., Plymate, S.R., Reed, M.J., 2008. Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. British journal of cancer 98(2), 250-255.

Szliszka, E., Krol, W., 2011. Soy isoflavones augment the effect of TRAIL-mediated apoptotic death in prostate cancer cells. Oncology reports 26(3), 533-541.

Szliszka, E., Krol, W., 2013. Polyphenols Isolated from Propolis Augment TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2013, 731940.

Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., Krol, W., 2011. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. International journal of oncology 38(4), 941-953.

Wang, Y.Z., Wong, Y.C., 1998. Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. The Prostate 35(3), 165-177.

Weibel, E.R., 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 12, 131-155.

Wong, C.P., Bray, T.M., Ho, E., 2009. Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. Cancer letters 276(1), 38-46.

## Biomonitoramento do extrato etanólico da própolis vermelha através de teste de atividade antiproliferativa *in vitro* em células tumorais e identificação do composto isolado.

#### Considerações sobre o capítulo 3

Esta parte do estudo teve como objetivo o fracionamento biomonitorado do extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV), visando o isolamento do composto ativo responsável pela atividade antiproliferativa apresentada pelo EEPV. O primeiro processo de purificação do EEPV se deu através da partição líquido-líquido, originando as frações hexânica, acetato de etila, butanólica e aquosa que foram testadas em 9 linhagens celulares de câncer humano e em uma linhagem não tumoral. As duas primeiras frações apresentaram elevada potência inibitória do crescimento das células estudadas, inclusive com atividade citocida. A fração acetato de etila, por apresentar perfil semelhante ao extrato bruto e por possuir menores valores de TGI (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular), foi escolhida para continuidade do processo de purificação através da cromatografia em coluna seca com sílica gel, que deu origem a sete frações. Dessas, as frações 3, 4 e 5 apresentaram melhores perfis antiproliferativos. Por apresentar-se mais purificada, a fração 5 foi escolhida e aplicada em uma coluna cromatográfica aberta de sílica em fase reversa, o que possibilitou a coleta de 30 subfrações. Cada subfração apresentou valores distintos de TGI e as frações que apresentaram melhor atividade nas linhagens testadas (U251, MCF-7, PC-3 e HT-29) foram as subfrações 20, 21, 22 e 23 com valores de TGI abaixo de 15 µg/mL para todas as linhagens. A subfração 20, que apresentou atividade antiproliferativa mais potente e maior rendimento, foi escolhida para o isolamento biodirecionado pela técnica de HPLC preparativo. Quatro subfrações foram coletadas e denominadas de Subfração 20.1, Subfração 20.2, Subfração 20.3 e Subfração 20.4. A subfração 20.3 apresentou o melhor rendimento e a melhor perfil de atividade antiproliferativa nas linhagens U251, MCF7 e HT-29, com valores de TGI abaixo de 11 µg/mL. Como a subfração 20.3 foi escolhida, optou-se por testá-la novamente na linhagem de câncer de cólon (HT-29) e na de câncer de próstata (PC-3) nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 nos tempos de 12, 24 e 48 horas a fim de selecionarmos o melhor intervalo de tempo e concentração para estudos futuros de ciclo e morte celular. Os resultados indicaram elevada atividade antiproliferativa, sendo que os menores valores de TGI foram de 2,55 µg/mL, após 24 horas de tratamento para a linhagem PC-3 e TGI de valor 3,23 µg/mL, após 48 de tratamento para a linhagem HT-29. Para dar andamento ao processo de isolamento da fração 20.3, foram realizados cromatogramas monitorados por UV, espectrometria de massas, análise do perfil químico e purificação por HPLC analítico, dando origem ao **composto isolado 1** que foi analisado por RMN. Pesquisas realizadas em diferentes bancos de dados indicam que esse composto encontrado é inédito na literatura e pertencente à classe dos isoflavonóides-neoflavonoides. Através do processamento químico bioguiado pudemos observar que tanto o EEPV quanto suas frações e subfrações não apresentam seletividade para uma linhagem tumoral específica, o que indica que seus efeitos são direcionados a um processo tumoral comum a diferentes tipos de tumor. Além disso, através da avaliação dos dados físico-químicos e espectrométricos desse estudo foi possível a determinação estrutural da molécula que é descrita pela primeira vez na literatura. Sabendo que a própolis vermelha é uma fonte de substâncias bioativas, o composto encontrado pode ser útil por si só ou em combinação com terapias convencionais para a prevenção da progressão e/ou tratamento de câncer.

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais representam uma das principais fontes de medicamentos utilizados no tratamento do câncer e muitas vezes inspiraram o desenvolvimento de novos agentes potenciais. No entanto, apesar do desenvolvimento da quimioterapia nos últimos 70 anos, ainda existe a necessidade de encontrar novas drogas para o tratamento desse conjunto de doenças que se desenvolve rapidamente, adquirindo resistência aos medicamentos anteriormente eficazes (Cragg *et al.*, 2014). A busca por novos agentes anticâncer exige uma pesquisa multidisciplinar envolvendo novas abordagens e a natureza continua a desempenhar um papel fundamental neste processo (Cragg & Newman, 2013).

A própolis tem sido utilizada há séculos na medicina popular e há muitos relatos que relacionam suas inúmeras propriedades biológicas com as variações em sua composição química (Righi *et al.*, 2011; Franchi *et al.*, 2012). Ela é de especial interesse por ser classificada como um alimento funcional. O mercado global de alimentos funcionais é estimado em mais de 30 bilhões de dólares nos Estados Unidos da América e continua crescendo a cada ano (Freires *et al.*, 2016). Nesse sentido, os benefícios nutracêuticos e biológicos da própolis têm sido amplamente explorados em várias áreas da medicina como um importante recurso na prevenção, gestão e tratamento de doenças sistêmicas. Especialmente na área de pesquisa de novas drogas anticâncer, muitos compostos isolados de diversos tipos de própolis têm apresentado atividade anticâncer em estudos *in vitro* e *in vivo* (Szliszka *et al.*, 2013).

Os potenciais efeitos anticâncer das própolis em geral estão relacionados à sua ação antiproliferativa frente a células tumorais, indução de apoptose, bloqueio das vias de sinalização de oncogenes específicos, efeitos anti-angiogênicos, modulação do microambiente tumoral e por agir potencialmente como tratamento adjuvante ou complementar nas terapias anticâncer convencionais (Frozza *et al.*, 2013, Valença *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2013). Apesar dos estudos existentes para os diferentes tipos de própolis, pouco se sabe sobre as ações biológicas da própolis vermelha, endêmica do Brasil.

A própolis vermelha brasileira, encontrada em áreas localizadas ao longo da costa e manguezais no nordeste brasileiro, apresenta uma composição química única enriquecida em isoflavonoides (Sena-Lopes *et al.*, 2018). Os polifenóis naturais referem-se a um grande grupo de metabólitos secundários das plantas, desde pequenas moléculas até compostos altamente polimerizados. A natureza química dos flavonoides depende de sua classe estrutural, grau de hidroxilação, outras substituições e conjugações e grau de polimerização (Zhou *et al.*, 2016). O recente interesse por estas substâncias surgiu devido aos potenciais benefícios para a saúde,

decorrentes das atividades antioxidantes destes compostos polifenólicos. Os grupos hidroxilos funcionais em flavonoides medeiam seus efeitos antioxidantes por eliminação de radicais livres e / ou quelação de íons metálicos. A quelação de metais pode ser crucial na prevenção da geração de radicais livres, que podem danificar biomoléculas alvo (Kumar & Pandey, 2013).

Estudos apontam que os metabólitos secundários de natureza fenólica, incluindo os flavonoides, são responsáveis por uma grande variedade de atividades farmacológicas (Kristo *et al.*, 2016). Os flavonoides estão entre os compostos mais ativos na própolis vermelha brasileira, atuando em diferentes processos fisiológicos, e desempenhando várias funções biológicas. A quercetina e a daidzeina possuem atividade anti-inflamatória (Kaidama *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2015). A formononetina, uma isoflavona, possui atividades estrogênica, anti-radical, citotóxica e antifúngica (Frozza et al., 2013). Outro flavonoide importante é o biochanin A, que é um marcador químico relevante identificado na própolis vermelha e tem importantes atividades como efeitos inibitórios sobre células cancerígenas, ação anti-inflamatória e outras (Kole et al., 2011). Dessa forma, pode-se esperar que a própolis vermelha brasileira não somente seja fonte de diversos compostos com atividades biológicas, sendo cada um deles um potencial a ser explorado, mas também que a própolis como um todo apresente diversos benefícios devido a ação combinada de todos seus componentes. De fato, inúmeros são os relatos de seu uso popular para diversos tipos de doença.

Portanto, os potenciais biológicos da própolis vermelha devem ser explorados, visando o entendimento de suas propriedades como alimento funcional na forma como é popularmente consumida (extrato bruto etanólico) e como fonte de novos compostos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo conduzir o isolamento de novas substâncias através do método bioguiado para a atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas, uma abordagem inédita no estudo dessa própolis.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 PROCESSAMENTOS QUÍMICOS

A coleta da própolis vermelha, obtenção dos extratos brutos e fracionamento foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP).

## 2.1.1. Coleta da própolis vermelha

Amostras de própolis vermelha brasileira foram coletadas na cidade de Maceió, Estado de Alagoas, nordeste do Brasil (9 ° 40 ' S, 35 ° 41' W) no final do verão, durante o mês de março de 2014. Três amostras de três diferentes caixas (colmeias) foram recolhidas para serem utilizadas neste estudo (Figura 1A).

#### 2.1.2 Extração e isolamento de compostos bioativos

A própolis vermelha bruta foi limpa retirando-se a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas e qualquer outro tipo de material estranho. Em seguida a amostra foi triturada, peneirada em peneiras de 18 "mesh" e homogeneizada. Após ser moída, para um pó fino (Figura 1B), 20 g (peso seco) da própolis foram dissolvidos em 250 mL de etanol 80% (v/v). A solução foi agitada a 70 °C durante 30 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi evaporado sob baixa pressão para produzir o extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) (Silva *et al.*, 2008). Diferente do proposto por Oldoni *et al.* (2011), que empregaram a atividade antimicrobiana como o ensaio para biomonitoramento para a etapa de fracionamento, nesse estudo realizamos enfocamos na atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas para acompanhamento das etapas de purificação. Sendo assim, foi realizado o fracionamento biomonitorado do extrato, através de diversos métodos cromatográficos. O processo completo do biodirecionamento está representado pela figura 3.

#### 2.1.3 Partição líquido-líquido

Em um funil de separação foram adicionados ao EEPV e hexano na proporção 1:1 (hexano/amostra). O processo foi repetido até a eluição de todos os compostos. A fração hexano foi evaporada sob vácuo e liofilizada. A amostra foi dissolvida em acetato de etila na proporção 1:1 (acetato de etila/amostra), utilizando-se uma mistura de acetato de etila e água na proporção de 5:3 (acetato de etila/água). O processo foi repetido até eluição de todos os compostos. A fração acetato foi evaporada sob vácuo e liofilizada. Posteriormente, lavou-se a amostra com butanol na proporção 1:1 (butanol/amostra). O processo foi repetido até a eluição de todos os compostos compostos resultando em duas frações, a primeira sendo butanol e a segunda uma fração aquosa exaurida. Ambas foram evaporadas sob vácuo e liofilizadas (Figura 1C).

#### 2.1.4 Cromatografia de coluna seca

Através do biomonitoramento a fração acetato foi escolhida para dar sequência ao processo de fracionamento. A coluna seca de 20 cm foi preparada utilizando membrana de celulose preenchida com sílica 60. A amostra foi incorporada em sílica gel 60 na proporção de 1:3 (amostra/sílica), foi acrescentado metanol à mistura que foi evaporada sob vácuo. O pó obtido foi acrescentado ao topo da coluna seca, e correspondeu, no máximo, à 1,5 cm de altura. Como eluente, utilizou-se uma mistura de clorofórmio e acetato de etila na proporção de 7:3. A coluna foi fracionada de acordo com o observado pela aplicação de luz ultravioleta (Figura 1D). As sete frações encontradas foram incorporadas à sílica, eluídas com metanol, evaporadas sob vácuo e liofilizadas. Para determinar a fração escolhida foi realizada uma cromatografia de camada delgada (figura 1E).



**Figura 1.** Processamentos químicos da própolis vermelha. A) Própolis vermelha *in natura* em coletores instalados em colmeias de *Apis melífera*; B) própolis vermelha triturada; C) Fracionamento líquido-líquido; D) Cromatografia em coluna seca e visualizada sob luz UV a 366 nm; E) Perfil observado por cromatografia de camada delgada (CCD) das frações obtidas por fracionamento em coluna cromatográfica seca. Eluente: acetato de etila/clorofórmio (3:7).

#### 2.1.5 Fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa C18

Após o fracionamento em coluna seca, a fração 5 foi escolhida, por apresentar atividade antiproliferativa e possuir menor quantidade de substâncias em sua composição (Figura 1E). Para dar prosseguimento ao processo bioguiado optou-se pela realização do fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa C18, com partículas de tamanho 40 a 63  $\mu$ m (Merck), pois a sílica reversa C<sub>18</sub> consiste em uma fase imóvel de baixa polaridade e uma fase móvel com gradiente de polaridade que passa através dela. O tempo de retenção é maior para as moléculas de natureza apolar, enquanto as moléculas de caráter polar eluem com maior rapidez. Foram utilizados 130 g da Sílica C<sub>18</sub> e a massa utilizada da fração 5 foi de 1,68 g, a qual foi diluída em metanol e evaporada sob vácuo (para eliminação do solvente) com 8,5 g de sílica C<sub>18</sub> (1:5), sendo em seguida aplicada no topo da coluna. A coluna, com 25 cm de comprimento e 9 cm de diâmetro foi previamente empacotada com o uso de metanol e condicionada com o gradiente inicial da fase móvel água:metanol (70:30) v/v. O gradiente utilizado variou de metanol:água (30:70) v/v a 100% metanol (Figura 2A). As subfrações foram coletadas de acordo com a coloração, com acompanhamento da luz ultravioleta (Figura 2B). Foram coletados 238 frascos de 15 mL que foram reunidos através de semelhança de perfil, monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD). Os 238 frascos deram origem a 30 subfrações (Figura 2C).



**Figura 2.** Fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa C18. A) Aspectos da coluna com sílica fase reversa (C<sub>18</sub>). B) coluna C<sub>18</sub> visualizada sob luz UV a 366 nm. C) amostras obtidas pelo fracionamento da própolis na coluna C<sub>18</sub>.

#### 2.1.6 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60  $F_{254}$  (Merck Co,). Uma alíquota de 10 µL das subfrações foi aplicada na placa. O tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 30 minutos, utilizando-se o sistema acetato de etila:clorofórmio (50:50, v/v), como fase móvel. As cromatoplacas foram visualizadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda 365 nm, antes e após a revelação com anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100 °C, por 5 minutos.

A partir do fracionamento foi possível obter as amostras que foram utilizadas nos testes *in vitro* e *in vivo* (Figura 3).

#### 2.1.7 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-FR)

As análises por HPLC em fase reversa do EEPV, fração acetato, fração 5 e subfrações 20, 21, 22 e 23 foram feitas de acordo com o método descrito por Alencar *et al.* (2007). Vinte microlitros de cada extrato foram injetados em um cromatógrafo líquido (Shimadzu Co) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e uma coluna de fase reversa  $C_{18}$  (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água:ácido acético (19:1 v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) com vazão constante de 0,8 mL/min. O gradiente iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30 °C e os cromatogramas foram processados utilizando o software Class-VP. Neste trabalho, foram utilizados os seguintes padrões autênticos de flavonoides e ácidos fenólicos (Extrasynthese Co. e Sigma Aldrich): formononetina, daidzeina, biochanin A, neovestitol, vestitol.

#### 2.1.8 Análise das subfrações com atividade antiproliferativa por HPLC preparativo

A subfração 20, que apresentou melhor atividade antiproliferativa, foi cromatografada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preparativo, utilizando uma coluna Shimadzu PREP-ODS (H) (250 x 20 mm) para o isolamento de compostos bioativos. A fase móvel utilizada foi água:ácido acético (19:1 v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) com vazão constante de 0,8 mL/min. O gradiente iniciou com 70% do solvente B, após 20 minutos 75% de B, com 24 minutos 90% de B permanecendo um minuto, em 30 minutos, 70% de B. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30 °C e os cromatogramas foram processados utilizando o software Class-VP. Os picos das subfrações foram eluídos e

recolhidos em um coletor automático de frações (FRC-10A, Shimadzu Co.), acoplado ao sistema de cromatografia. A detecção variou de 200 a 400 nm. Através do biomonitoramento a subfração 20.3 foi escolhida para as análises seguintes e determinação estrutural.



**Figura 3.** Ilustração do processo de fracionamento e isolamento biodirecionado. A partir do extrato etanólico da própolis vermelha todas as frações e subfrações foram testadas biologicamente através do ensaio antiproliferativo *in vitro*.

## 2.1.9 Caracterização das frações ativas por espectrometria de massas de alta resolução (HRESI-MS)

A técnica utilizada trata-se de método de análise de extratos vegetais via espectrometria de massas (MS) com infusão direta de amostra, técnica analítica denominada

*fingerprinting* ou impressão digital química (Cabral, 2010). Essa abordagem envolve o mínimo preparo de amostra. A metodologia analítica envolveu espectrometria de massas (MS) (Q Exactive, Thermo Scientific – Bremen, Alemanha) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As amostras (10 mg) foram dissolvidas em 1 mL de metanol e 10  $\mu$ L desta solução foi diluída em 990  $\mu$ L de uma mistura de Metanol/água (1:1, v/v) com 0,1 % de ácido fórmico (99 %) para ionização no modo positivo e com 0,1 % de hidróxido de amônio (25 %) para ionização no modo negativo. As soluções das amostras foram injetadas por inserção direta via bomba seringa no espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific – Bremen, Alemanha). O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS (*full scan*) foram adquiridos na faixa de *m/z* 150 a 1800, até um valor pouco acima do *m/z* do íon em estudo e com energia de colisão de 10 - 40 eV. As condições gerais de operação do equipamento foram: voltagem do spray de 3500 V, temperatura do capilar de 320 °C, pressão do *sheat gas* de 10 psi e nível de RF da S-Lens de 50 V. Os espectros foram tratados com o software Xcalibur (Thermo Scientific – Bremen, Alemanha), específico do espectrômetro de massas.

Após o isolamento, reportado no item 3.1.7, a subfração 20.3 foi dividida em duas partes para que fosse possível a análise química juntamente com a determinação estrutural da molécula obtida e a análise biológica para avaliação de atividade antiproliferativa. A análise química não seria possível sem o suporte e comprometimento do Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli, do Instituto de Química da UNICAMP. Parte da subfração 20.3 foi enviada aos cuidados do Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck e Dr<sup>a</sup> Juliana Regina Gubiani do Grupo de Química Orgânica e Sistemas Biológicos da Universidade de São Paulo - Instituto de Química - São Carlos/SP. A subfração 20.3 apresentou impurezas (denominada a partir de agora subfração 20.3 A) e foi solicitada a avaliação da subfração 20.3 B).

#### 2.1.10 Análise do perfil químico e purificação por HPLC-UV-MS

As frações obtidas (subfração 20.3 A e subfração 20.3 B) foram submetidas a análises por HPLC-UV-MS utilizando-se equipamento Waters Alliance 2695 acoplado em linha com detector de arranjo de fotodiodos Waters 2996 e um detector de espectrometria de massa Micromass ZQ2000 com uma interface de eletropulverização. A matriz de fotodiodos digitalizou amostras entre 320 e 254 nm. O detector de espectrometria de massas foi utilizado nas seguintes condições: tensão capilar, 3,00 kV; temperatura do bloco fonte, 100 °C; temperatura de dessolvatação, 350 °C, operando em modo positivo de *electrospray*; Alcance

de detecção: 200-800 Da com extração total de contagem de íons. A coluna utilizada foi uma coluna C<sub>18</sub>, (X-Terra RP 18, 4,6 x 250 mm; 5 $\mu$ m, Waters<sup>®</sup>) e gradiente de eluição de metanol em água (0,1% de ácido fórmico), com fluxo de 1 mL/min durante aproximadamente 45 minutos.

## 2.1.11 Análise do perfil químico e purificação por HPLC analítico e RMN

As impurezas observadas em ambas as frações levaram à reunião destas resultando em 2,0 mg da subfração 20.3AB que foi então purificada em HPLC analítico.

Foi utilizado um equipamento Waters acoplado a um detector de ultravioleta Waters 2489 UV/Visible detector e coluna analítica  $C_{18}$  InertSustain (5 µm, 4.6 x 250 mm, GL Sciences) em modo isocrático 50:10:40 MeOH/MeCN/H<sub>2</sub>O em 65 min com um fluxo de 1.0 mL/min.

Após total purificação da amostra, foram obtidos espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC e HMBC da amostra obtida. Estes espectros foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance 600 (14.1 Tesla), usando sonda direta, multinuclear BBO 600 MHz S3. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram referenciados ao sinal residual de DMSO- $d_6$  ( $\delta$  2,49 ppm e  $\delta$  39,5 ppm) ou ao padrão interno de tetrametilsilano (TMS). Foram realizadas pesquisas nos bancos de dados *Dictionary of Natural Products* e *SciFinder*.

O composto obtido foi isolado e denominado **composto isolado 1** como um óleo de coloração castanha, de massa 0.9 mg. A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de alta resolução no modo negativo (HRESI-MS).

## 2.2 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA IN VITRO.

#### 2.2.1 Linhagens celulares

Para o teste de atividade antiproliferativa foram empregadas até 10 linhagens de células tumorais humanas (Tabela 1). Estas linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-US) e mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Corning<sup>®</sup>, EUA) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Gibco<sup>™</sup>, EUA) e 1% (v/v) de solução de penicilina:estreptomicina (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, 1000 U/mL:1000 g/mL), e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Além das linhagens tumorais, empregou-se também uma linhagem não-tumoral de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), doada pelo Dr. Ricardo Della Coletta (FOP, UNICAMP).

Foram inoculados 100 µL/compartimento de cada suspensão celular, em diferentes densidades celulares (Tabela 1) em placas de 96 compartimentos (Corning<sup>®</sup>, EUA), que foram

incubadas por 24 horas (placa teste). Da mesma forma, preparou-se a placa controle (placa T0), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

Linhagem Celular	Nome	DI*(x10 <sup>4</sup> células/mL)
Pulmão	NCI-H460	5,0
Mama	MCF-7	6,0
Ovário com fenótipo de	NCI-	5,0
resistência	ADR/RES	
Cólon	HT-29	4,0
Próstata	PC-3	5,0
Melanoma	UACC-62	4,0
Ovário	OVCAR-3	7,0
Rim	786-0	4,5
Glioma	U251	4,0
Leucemia	K562	6,0
Queratinócito humano (não tumoral)	HaCat	4,0

**Tabela 1**: Linhagens celulares tumorais e não tumoral (HaCat) utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro* e suas densidades de inoculação (DI)

# 2.2.2 Triagem farmacológica em teste antiproliferativo em cultura de células tumorais e não tumorais humanas *in vitro*

Para a preparação das amostras, uma alíquota de cada amostra (10 mg) foi dissolvida em 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Alemanha). Em seguida, 50  $\mu$ L dessa solução-mãe foram dispersos em 950  $\mu$ L de meio completo, para preparação da solução de trabalho, a qual foi diluída sucessivamente, em meio completo, para a preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu$ g/mL (Figura 4). As linhagens foram tratadas com as amostras diluídas (100  $\mu$ L/compartimento, em triplicata), as quais foram incubadas por 48 horas. A concentração final de DMSO (0,25%) utilizada neste teste não interferiu na viabilidade celular conforme resultados anteriores obtidos em nosso grupo de pesquisa (Longato *et. al.*, 2015). As frações obtidas após a técnica de HPLC preparativo (subfrações 1, 2 e 3) foram testadas nas concentrações finais de 0,25; 2,5; 12,5 e 25  $\mu$ g/mL em triplicata. A concentração de 12,5  $\mu$ g/mL foi adicionada e a concentração de 250  $\mu$ g/mL foi retirada da avaliação antiproliferativa pois, apesar desse método apresentar controle de cores para cada amostra e cada concentração, a intensidade da cor vermelha da amostra na maior concentração superaria a cor da sulforrodamina, interferindo na leitura da placa. Essas amostras foram testadas em um número menor de linhagens, devido a menor disponibilidade
de material, priorizando estudos mais específicos. Além disso, a subfração 20.3 foi testada em diferentes tempos (12, 24, e 48 horas).



**Figura 4.** Esquema da configuração da placa de 96 compartimentos utilizada nos testes de atividade antiproliferativa (adaptado de Monteiro, 2012).

Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina (Cloridrato de doxorrubicina<sup>®</sup> - Europharma, Brasil), nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata. As células da placa controle T0 foram fixadas com ácido tricloroacético no momento da adição das amostras, conforme descrição a seguir, para determinação da quantidade de células no início do tempo de exposição. Ao final de 48 horas de exposição, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) a 50% (p/v) e incubadas por 1 hora a 4 °C. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água corrente para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. O TCA atua como um fixador, precipitando proteínas. Células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas. Depois de secas completamente à temperatura ambiente, as células fixadas foram coradas com 50  $\mu$ L/compartimento de sulforrodamina B 0,4% (p/v) em ácido acético 1%; e mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente. A sulforrodamina B é um corante protéico que se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação ou seja, o método independe da atividade metabólica das células (Monks et al, 1991). A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150  $\mu$ L/compartimento de Trizma Base (10  $\mu$ M, pH 10,5) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA).

#### 2.2.3 Análise dos dados

A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 540nm em leitor de microplacas (Molecular Devices<sup>®</sup>, modelo VersaMax). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos (cores) e, através das fórmulas a seguir, foi determinada a porcentagem de crescimento de cada amostra testada.

Se TA > T1, a amostra estimulou o crescimento.

Se T1  $\geq$ TA>T0, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi 100 X [(TA- T0)/ (T1- T0)].

Se TA< T0, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi 100 X [(TA- T0)/(T0)].

Sendo TA a média da absorbância da célula tratada, T1 o controle de célula e T0 o controle das células no dia da adição das amostras, obteve-se então a porcentagem de crescimento. Os dados de absorbância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do software Origin<sup>®</sup> 8.0, foi feita a regressão linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foram calculados os seguintes parâmetros: TGI (*total growth inhibition*) concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (utilizado para amostras citocidas) e LC<sub>50</sub> (concentração necessária para matar 50% das células. Esses parâmetros são utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade das mesmas.

#### **3. RESULTADOS**

## **3.1 PROCESSAMENTOS QUÍMICOS**

### 3.1.1 Separação líquido-líquido

O primeiro processo de purificação deu origem às frações hexânica, acetato de etila, butanólica e aquosa. As frações de interesse obtidas foram acompanhadas de testes para avaliação da atividade antiproliferativa, o que propiciou o biomonitoramento do processamento químico de purificação. O EEPV, frações hexânica e acetato de etila promoveram inibição de crescimento das células estudadas, inclusive com atividade citocida para as concentrações de 25 e 250 µg/mL (Figura 5). A fração acetato de etila, por apresentar perfil semelhante ao EEPV e por promover inibição total de crescimento em menores concentrações (apresentar menores valores de TGI), foi escolhida para continuidade do processo de purificação (Tabela 2).

líquido- l	íquido.	çao da a		ipioniei				is offull	uas ua i	separação
			NCI/ADR-		NCI-		OVCAR-		K-	
	U251	MCF7	RES	786-0	H460	PC-3	3	HT29	562	НаСаТ
EEPV	20,34	24,93	28,54	24,55	44,96	44,93	32,89	20,21	28,80	48,20
Acetato de Etila	18,64	33,37	35,44	30,27	17,59	32,72	30,85	37,34	17,92	33,29
Hexano	31,87	67,93	54,17	32,32		33,81	34,78		46,48	46,38
Butanol	223,65	223,84	186,35	105,13		*	213,13		*	*
Aquoso	*	*	*	70,00	*	*	*		*	*

18,96 6,21

7.97

20,45

2,43

5,74

**Tabela 2:** Valores de TGI (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular) na avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* das amostras oriundas da separação líquido-líquido.

\* Valores maiores que 250 µg/mL

0,20

10,41

2,97

0,84

Doxo



**Figura 5.** Atividade antiproliferativa do extrato etanólico e das frações hexânica, acetato de etila, butanol e aquosa do extrato etanólico da própolis vermelha e o controle positivo Doxorrubicina em painel de 9 linhagens tumorais humanas e uma linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra nas concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu$ g/mL.

#### 3.1.2. Cromatografia de Coluna Seca

O processo de purificação da fração acetato de etila deu origem a sete frações. Dessas, as frações de número 3, 4 e 5 continham menos compostos (Figura 6) e mostraram-se as mais potentes em inibir o crescimento celular, com atividade citocida nas maiores concentrações (25 e 250  $\mu$ g/mL) (Figura 7), menores valores de TGI (Tabela 3) e perfil semelhante ao EEPV e à fração acetato de etila. Por apresentar-se mais purificada, a fração 5 foi selecionada para a continuidade dos processos de isolamento dos princípios ativos.



**Figura 6.** Perfil observado por CCD das frações obtidas da fração acetato de etila por fracionamento em coluna cromatográfica seca. Uso de acetato de etila/clorofórmio (3:7).

**Tabela 3.** Valores de TGI (concentração necessária para diminuir totalmente o crescimento celular) na avaliação de antiproliferativa *in vitro* das amostras oriundas da coluna seca.

	U251	MCF7	NCI/ ADR-RES	786-0	NCI- H460	PC-3	OVCAR- 3	K-562	HaCaT
EEPV	32,67	30,10	33,12	29,86	57,14	46,73	35,63	34,88	69,47
Fração 1	28,15	40,08	30,26	27,91	48,26	30,29	31,76	32,77	64,72
Fração 2	23,94	50,34	32,07	33,90	48,04	30,97	37,04	25,66	61,25
Fração 3	25,07	25,49	21,71	24,78	46,64	44,30	25,24	26,03	61,25
Fração 4	40,63	49,96	33,75	34,72	51,60	30,12	47,80	36,59	17,87
Fração 5	35,98	24,66	47,12	77,02	122,40	76,69	29,04	36,59	52,37
Fração 6	28,59	36,69	75,35	122,89	172,16	40,62	94,20	68,70	48,61
Fração 7	98,41	132,85	121,98	99,75	93,01	*	*	*	120,37

\* Valores maiores que 250 µg/mL



**Figura 7.** Atividade antiproliferativa de 7 frações obtidas da fração acetato de etila em painel de 8 linhagens tumorais humanas e uma linhagem não-tumoral, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra nas concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu$ g/mL.

#### 3.1.3 Fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa C18

A fração 5 oriunda do fracionamento por cromatografia em coluna seca foi aplicada em uma coluna cromatográfica aberta de sílica em fase reversa, o que possibilitou a coleta de diversas subfrações, as quais foram reunidas por possuírem mesmo perfil cromatográfico em 30 subfrações que podem ser visualizadas na Figura 8.



**Figura 8.** Aspecto das 30 subfrações obtidas através do fracionamento da fração 5 em coluna aberta com sílica fase reversa  $C_{18}$ .

As subfrações coletadas apresentaram colorações em diferentes tons de amarelo, laranja, vermelho e rosa, com grande variação nas tonalidades. O rendimento de cada uma das subfrações é mostrado na Tabela 4.

116

Fração	Solvente de eluição	Rendimento (mg)
Subfração 1	Metanol 30: 70 água	27,5
Subfração 2	Metanol 30: 70 água	6,1
Subfração 3	Metanol 30: 70 água	1,7
Subfração 4	Metanol 30: 70 água	1,1
Subfração 5	Metanol 30: 70 água	2,8
Subfração 6	Metanol 30: 70 água	1,7
Subfração 7	Metanol 30: 70 água	3,7
Subfração 8	Metanol 40: 60 água	22,9
Subfração 9	Metanol 50: 50 água	5,8
Subfração 10	Metanol 60: 40 água	7,7
Subfração 11	Metanol 70: 30 água	12
Subfração 12	Metanol 70: 30 água	35,2
Subfração 13	Metanol 70: 30 água	28,2
Subfração 14	Metanol 70: 30 água	30,5
Subfração 15	Metanol 70: 30 água	50,9
Subfração 16	Metanol 70: 30 água	103,2
Subfração 17	Metanol 70: 30 água	73,9
Subfração 18	Metanol 70: 30 água	147,9
Subfração 19	Metanol 80: 20 água	63,2
Subfração 20	Metanol 80: 20 água	340,0
Subfração 21	Metanol 80: 20 água	117,5
Subfração 22	Metanol 80: 20 água	9
Subfração 23	Metanol 80: 20 água	9,7
Subfração 24	Metanol 80: 20 água	18
Subfração 25	Metanol 90: 10 água	19,4
Subfração 26	Metanol 90: 10 água	18,7
Subfração 27	Metanol 90: 10 água	17,8
Subfração 28	Metanol 100: 0 água	7,8
Subfração 29	Metanol 100: 0 água	12,5
Subfração 30	Metanol 100: 0 água	22

**Tabela 4:** Solventes utilizados no fracionamento em coluna aberta  $C_{18}$  e rendimento das subfrações obtidas a partir de 1,250 g da fração 5.

As subfrações 18, 20 e 21 apresentaram os maiores rendimentos no fracionamento, enquanto as subfrações 3 a 7 foram as que apresentaram os menores valores. No geral, as subfrações iniciais (1-9) apresentaram rendimentos baixos.

Os perfis cromatográficos de todas subfrações analisados estão apresentados na Figura 9.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico da fração 5 que através fracionamento em coluna aberta  $C_{18}$  de deu origem a 30 subfrações. Eluente: acetato de etila:clorofórmio (50:50 v/v), visualizadas sob a luz UV 366 nm.

De acordo com Wagner *et al.* (1984) compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonoides, tendem a fluorescer na cor azul. De acordo com a figura 8 é possível observar que a coluna foi completamente eluída em relação à composição química da fração 5 inicialmente aplicada. As subfrações eluídas apresentaram perfis diferentes, dentro de um gradiente de polaridade bem distinto. A partir da subfração 9 é possível observar diferentes tons de azul e as subfrações 17, 20 e 24 se destacaram por apresentarem bandas laranjas fluorescentes quando irradiadas em UV 366 nm.

# **3.1.4** Atividade antiproliferativa *in vitro* das subfrações obtidas a partir do fracionamento em coluna aberta C<sub>18</sub>

Cada subfração apresentou valores distintos de TGI (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular). As frações iniciais 1 a 11 apresentaram TGI acima 250  $\mu$ g/mL o que caracteriza baixa atividade antiproliferativa (Tabela 5). As frações que apresentaram melhor atividade foram 20, 21, 22 e 23 com valores de TGI abaixo de 15  $\mu$ g/mL para todas as linhagens (Tabela 5).

Frações	U251	MCF7	PC-3	HT29
EEPV	26,93	28,54	38,66	22,18
Fração 5	33,49	27,74	70,40	20,33
Subfração 1	*	*	*	*
Subfração 2	*	*	*	*
Subfração 3	*	*	*	*
Subfração 4	*	167,85	*	*
Subfração 5	*	150,61	*	*
Subfração 6	*	*	*	*
Subfração 7	144,37	169,65	125,57	224,44
Subfração 8	169,19	112,94	142,63	230,77
Subfração 9	105,85	120,89	66,15	222,46
ubfração 10	74,71	106,55	50,83	210,37
ubfração 11	39,55	114,29	58,65	125,65
ubfração 12	35,96	59,44	33,11	40,22
ubfração 13	31,79	67,39	18,40	24,80
ubfração 14	105,95	119,57	65,30	223,58
ubfração 15	18,67	20,24	11,39	13,82
ubfração 16	13,72	19,12	14,16	14,75
ubfração 17	14,35	44,60	43,35	25,22
ubfração 18	13,99	18,25	19,72	15,14
ubfração 19	10,96	25,94	16,30	17,08
ubfração 20	4,48	8,51	4,81	8,45
ubfração 21	5,90	6,21	5,45	11,75
ubfração 22	7,45	8,40	7,99	15,65
ubfração 23	6,72	8,07	8,57	14,90
ubfração 24	7,80	23,87	4,20	18,48
Subfração 25	25.40	32.12	30.37	28.65

21,88

23,31

Subfração 26

12,72

29,77

**Tabela 5:** Valores de TGI (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular) na avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* das subfrações obtidas a partir do

Subfração 27	74,62	74,19	121,25	117,13
Subfração 28	98,15	111,13	154,78	216,37
Subfração 29	135,97	139,81	218,06	110,93
Subfração 30	209,91	166,46	212,13	222,22

\* Valores maiores que 250 µg/mL

Essas subfrações também apresentaram atividade citocida, com valores de  $LC_{50}$  (concentração necessária para matar 50% das células) abaixo de 25 µg/mL para todas as linhagens testadas (Tabela 6). A subfração 20 foi escolhida para dar continuidade ao processo de isolamento, pois apresentou os melhores valores de TGI e  $LC_{50}$ .

**Tabela 6:** Valores de LC<sub>50</sub> (concentração necessária para matar 50% das células) na avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* das subfrações obtidas a partir do fracionamento em coluna aberta  $C_{18}$ .

Frações	U251	MCF7	PC-3	HT29
Subfração 20	16,91	25,98	19,69	20,67
Subfração 21	21,65	25,35	23,62	21,58
Subfração 22	20,65	23,26	22,90	25,10
Subfração 23	20,48	24,78	24,04	22,92

A fim de obter uma comparação semelhante entre as amostras 20, 21, 22 e 23 (figura 10) o TGI e o LC<sub>50</sub> foram calculados baseados nas concentrações 0,25; 2,5 e 25  $\mu$ g/mL. O valor de 250  $\mu$ g/mL foi retirado da análise pois, as amostras 20 e 21 na concentração de 250  $\mu$ g/mL apresentaram uma diminuição não esperada na sua atividade antiproliferativa (Figura 10). Esse aumento nos valores, na maior concentração, pode ter ocorrido pela intensidade da cor vermelha das amostras (Figura 11), o que acabou interferindo na leitura destas (há um falso positivo quando a cor da amostra supera a cor da sulforrodamina, o que é detectado pela leitura do controle de cor da amostra).



**Figura 10.** Atividade antiproliferativa das subfrações 20, 21, 22 e 23 provenientes da fração 5 do extrato acetato de etila da própolis vermelha em painel de 4 linhagens tumorais humanas, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra nas concentrações 0,25; 2,5; 25 e 250  $\mu$ g/mL.



**Figura 11.** Intensidade de cores das subfrações 20 a 23 obtidas a partir do fracionamento em coluna aberta  $C_{18}$ .

# 3.1.5 Isolamento das subfrações com atividade antiproliferativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) preparativo.

Os cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência do EEPV e de suas frações demonstram uma composição química complexa, com vários picos em diferentes tempos de retenção (Figura 12). O processo de fracionamento líquido-líquido originou a fração acetato que concentrou a maioria dos compostos do EEPV.



**Figura 12.** Cromatogramas do EEPV e da fração acetato de etila obtidos por HPLC-FR. A) Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV), B) Fração Acetato de etila. Detectados a 280 nm por HPLC – FR

Nos resultados obtidos por HPLC, os flavonoides Daidzeina, Vestitol, Formononetina, UV  $\lambda$  234, 261nm, Neovestitol e Biochanin foram identificados. Esses resultados estão de acordo com Alencar *et al.* (2007), demonstrando que a própolis vermelha é diferente de todas as demais própolis brasileiras e que o material que obtivemos está de acordo com os dados de literatura (Figura 13).



**Figura 13.** Cromatogramas do EEPV obtidos por HPLC-FR. (1) Daidzeina (2) Vestitol (3) Formononetina (4) UV  $\lambda$  234, 261nm (5) Neovestitol (6) Biochanin A. Detectados a 260 nm por HPLC – FR

A fração 5, obtida através do fracionamento em coluna seca, apresentou um cromatograma diferente da fração acetato, com menos picos, caracterizando uma melhor purificação da fração que deu origem a ela (Figura 14).



**Figura 14.** Cromatograma da fração 5 obtida por HPLC-FR. Detectados a 280 nm por HPLC – FR.

Após o fracionamento por  $C_{18}$ , foram escolhidas para a análise por HPLC-FR as subfrações que apresentaram o melhor rendimento e as melhores atividades antiproliferativas, sendo elas as frações 20, 21, 22 e 23. Como pode ser visualizado na figura 15, o processo de fracionamento em coluna  $C_{18}$  produziu frações distintas e com um menor número de compostos majoritários em relação a fração 5.

A subfração 20, que apresentou atividade antiproliferativa mais potente e maior rendimento, foi escolhida para o isolamento biodirecionado das subfrações com alta atividade

antiproliferativa pela técnica de HPLC preparativo. Quatro subfrações foram coletadas (picos marcados no cromatograma) e denominadas de Subfração 20.1, Subfração 20.2, Subfração 20.3 e Subfração 20.4 oriundos da Subfração 20 (Figura 16). Entretanto, a Subfração 20.4 apresentou baixo rendimento, o que impossibilitou suas análises de atividade antiproliferativa (Tabela 7).



**Figura 15.** Cromatograma das subfrações obtidas por HPLC-FR. Subfrações obtidas através do fracionamento (A) Subfração 20; B) Subfração 21; C) Subfração 22 (D) Subfração 23. Detectados a 280 nm por HPLC – FR.



**Figura 16.** Cromatograma de coleta das subfrações obtidas da subfração 20 por HPLCpreparativo. Detectados a 280 nm por HPLC – FR

Composto	Rendimento (mg)
Subfração 20.1	14,2
Subfração 20.2	4,8
Subfração 20.3	26,8
Subfração 20.4	1,2

**Tabela 7.** Rendimento das subfrações obtidas a partir de 67,47 mg da subfração 20 por HPLC preparativo.

3.1.6 Atividade antiproliferativa *in vitro* das subfrações obtidas por HPLCpreparativo.

Como o rendimento das subfrações foi baixo, optou-se por realizar o teste de atividade antiproliferativa em somente 3 linhagens tumorais U251, MCF7 e HT-29, a fim de utilizar menor massa e guiar os próximos passos de identificação das subfrações, a linhagem PC-3 não foi utilizada pois a mesma apresentou contaminação. As concentrações utilizadas para o teste foram 0,25; 2,5; 12,5 e 25 µg/mL, pois conforme explicado pelo item 3.2.2 a concentração de 250 µg/mL pode apresentar interferências nas análises espectrofotométricas por possuir cor avermelhada intensa (Figura 17).

A subfração 20.3 apresentou o melhor rendimento e a melhor atividade antiproliferativa, com valores de TGI abaixo de 11  $\mu$ g/mL (Tabela 8). A Subfração 20.2 não apresentou atividade antiproliferativa.

celular) na avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* do extrato etanólico e das subfraçõess obtidas por HPLC preparativo.

 Frações
 U251
 MCF7
 HT29

Tabela 8: Valores de TGI (concentração necessária para inibir totalmente o crescimento

Frações	U251	MCF7	HT29
EEPV	14,40	27,42	33,44
Subfração 20.1	13,25	13,15	21,40
Subfração 20.2	*	*	*
Subfração 20.3	7,17	11,01	9,31

\* Valores maiores que 250 µg/mL



**Figura 17.** Atividade antiproliferativa das subfrações 20.1, 20.2 e 20.3 oriundas da subfração 20 da própolis vermelha em painel de 3 linhagens tumorais humanas, após 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra nas concentrações 0,25; 2,5; 12,5 e 25  $\mu$ g/mL.

#### 3.1.7 Atividade antiproliferativa in vitro da subfração 20.3 nas linhagens PC-3 e HT29

Tendo em vista o melhor rendimento e melhor atividade da subfração 20.3, ela foi testada em na linhagem de câncer de cólon (HT-29) e na de câncer de próstata (PC-3) nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 nos tempos de 12, 24 e 48 horas para testes posteriores (Figura 18). Sabendo que a própolis possui conhecida atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, essas duas linhagens são de interesse, pois na literatura há poucos estudos avaliando a influência da própolis sobre esses dois tipos de câncer, nos quais o processo inflamatório é reconhecidamente um fator importante para seu desenvolvimento. Os resultados indicaram elevada atividade antiproliferativa sendo que os menores valores de TGI foram de 2,55 µg/mL em 24 horas de tratamento para a linhagem PC-3 e TGI de valor 3,23 µg/mL em 48 de tratamento para a linhagem HT-29 (Tabela 9). A atividade citocida da subfração pôde ser observada, pois a partir das 48 horas de tratamento para a linhagem PC-3,

o valor de LC-50 foi menor que 9,49  $\mu$ g/mL na linhagem PC-3 e 16,18  $\mu$ g/mL para a linhagem HT-29 (Tabela 10).

	Subfra	ação 20.3		PC-3			HT-29		
celular) na a	valiação da	atividade a	antiprolife	erativa <i>in vi</i>	<i>tro</i> da	Subfra	ação 20.3.		
Tabela 9. V	Valores de	TGI (conc	centração	necessária	para	inibir	totalmente	0	crescimento

Subfração 20.3	PC-3	HT-29
12hrs	4,61	8,22
24hrs	2,55	5,43
48hrs	2,90	3,23

**Tabela 10.** Valores de  $LC_{50}$  (concentração necessária para matar 50% das células) na avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* da subfração 20.3.

Subfração 20.3	PC-3	HT-29
12hrs	9,49	16,18
24hrs	7,06	10,36
48hrs	5,18	5,00



**Figura 18.** Atividade antiproliferativa da subfração 20.3 oriunda da subfração 20 da própolis vermelha em painel de 2 linhagens tumorais humanas, após 12, 24 e 48 horas de tratamento. O gráfico relaciona a porcentagem de crescimento celular e a amostra nas concentrações 1;5;10;15;20 e 25 µg/mL.

#### 3.1.8 Análise do perfil químico e purificação por HPLC-UV-MS

Para dar andamento ao processo de isolamento foi realizado um cromatograma monitorado por UV e espectro de MS das frações que haviam sido separadas para diferentes análises (químicas e biológicas). A subfração 20.3A apresentou um pico com o composto majoritário e algumas impurezas (Figura 19A). Para a subfração 20.3B foi possível observar o composto majoritário com uma maior contaminação (Figura 19B). A figura 19C mostra a reunião das frações Subfração 20.3A e B no espectro de MS sendo possível observar o composto majoritário e as impurezas.



**Figura 19**. Cromatograma monitorado por UV (absorção em 254 nm) das frações (A) Subfração 20.3A e (B) Subfração 20.3B. Análise realizada com coluna X-Terra RP 18 (4,6 x 250 mm; 5 $\mu$ m, Waters<sup>®</sup>) e gradiente de eluição de MeOH/MeCN em H<sub>2</sub>O (0,1% de ácido fórmico): 10% à 100% de MeOH/MeCN de 1-22 min, permanecendo nesta condição por 5 min e voltando-se a condição inicial de eluição em 3 min. (C) Espectro de MS (ESI-) do pico em tr 19,6 min das subfrações 20.3A e 20.3B.

# 3.1.9 Análise do perfil químico e purificação por HPLC analítico e análise de RMN do Composto Isolado 1.

Tendo em vista a presença do mesmo pico majoritário nas duas subfrações (20.3 A e 20.3 B), essas foram reunidas obtendo uma nova fração contendo 2,0 mg (subfração 23 AB). Esta nova subfração foi então repurificada em HPLC analítico dando origem ao composto isolado 1. O MS do composto repurificado encontra-se na Figura 20. Através dos dados obtidos, pelos espectros de carbono e hidrogênio, analisamos os dados pelo programa ChemBioDraw Ultra que gerou uma previsão espectral, permitindo uma análise de estrutura teórica para o composto. Os dados obtidos através da técnica de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C estão na tabela 14 (espectros reportados no apêndice).



Figura 20. Espectro de MS (ESI-) do pico em t<sub>R</sub> 19,6 min do composto isolado 1.

**Tabela 11.** Dados de RMN (<sup>1</sup>H 600 MHz, <sup>13</sup>C 150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) para o composto isolado .

		Con	nposto isolado (1)
Anel	Posição	$\delta_{\rm C}$ , type	$\delta_{\rm H} (J \text{ in Hz})$
A	5	130.3, CH	6.88 (d, 8.4)
	6	106.7, CH	6.39 (dd, 8.4; 2.5)
	7	158.6, C	
	8	101.1, CH	6.26 (d, 2.5)
	9	154.8, C	
	10	114.6, C	
В	1'	119.8. C	
	2'	153.8. C	
	3'	102.3. CH	6.32 (s)
	4'	153.7. C	
	5'	116.8. C	
	6'	128.1, CH	6.55 (s)
C	2	69.6 CH2	4.05 (m) = 3.67 (m)
C	2	31.1 CH	3 16 (m)
	4	29.7, CH <sub>2</sub>	2.56 (d, 8.0)
D	4	120.1 CH	7 17 (d. 8 5)
D	5	110.5 CH	6.71 (dd 84.22)
	6	157.0 C	0.71 (dd, 0.1, 2.2)
	0 7	957 CH	7 02 (d. 2 2)
	8	154.7 C	7.02 (d, 2.2)
	9	123.2, C	
F	1'	111 G C	
17	1 2'	156 5 C	
	2 3'	103.2 СЦ	6 37 (d. 2 3)
	3 1'	105.2, CII 150 <i>A C</i>	0.37 (u, 2.3)
		1060 СЦ	6 27 (dd 8 3· 2 3)
	5 6'	132.0, CH	7.07 (d, 8.4)
	~	, <b></b>	
F	2	148.6, C	
	3	116.5, C	

### 4. DISCUSSÃO

O processo de fracionamento separa compostos com polaridades, composições e propriedades farmacológicas individualizadas e muitas vezes diferentes daquelas apresentadas pelo sistema sinérgico inicial. O fracionamento biomonitorado tem sido utilizado para a descoberta de princípios ativos de produtos naturais e, neste estudo, está sendo utilizado para reconhecer compostos bioativos com atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas a partir do extrato etanólico de própolis vermelha brasileira (Oldoni *et al.*, 2011). Para tanto, foram utilizados diversos métodos cromatográficos combinados com ensaios para avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas. O isolamento e purificação de quantidades suficientes de princípios ativos a partir da triagem *in vitro* permitem a seleção dos melhores candidatos aos estudos em modelos experimentais de câncer *in vivo* (Bueno-Silva *et al.*, 2013; Monks *et al.*, 1991).

O extrato etanólico da própolis vermelha, a fração hexânica e a fração acetato de etila apresentaram um perfil de atividade antiproliferativa semelhante, com valores de TGI variando entre 20 e 44  $\mu$ g/mL para o extrato etanólico e fração acetato de etila e entre 30 e 68  $\mu$ g/mL para a fração hexânica. Entretanto, as frações butanólica e aquosa não apresentaram ação antiproliferativa (TGI > 250  $\mu$ g/mL). Estes resultados sugerem que o potente efeito antiproliferativo da própolis vermelha pode estar relacionado aos compostos de média polaridade, como observado pelo perfil cromatográfico. As frações testadas em painel de cultura de células não apresentaram ação seletiva nas linhagens tumorais utilizadas.

As frações hexânica e acetato de etila apresentam em sua composição benzofenonas preniladas, pterocarpanos, chalconas, isoflavonas e isoflavanas (Oldoni *et al.* 2011). A fração acetato de etila, por apresentar perfil de atividade antiproliferativa semelhante ao do EEPV e por possuir menores valores de TGI comparadas às outras frações, foi escolhida para continuidade do processo de purificação.

Das sete subfrações provenientes da fração acetato de etila, as subfrações 3, 4 e 5 apresentaram melhores perfis de atividade, com ação citocida nas concentrações de 25 e 250  $\mu$ g/mL. Mesmo com semelhante atividade antiproliferativa, as frações 3, 4 e 5 apresentam perfis cromatográficos diferentes. Dessa forma, pode-se inferir que as manchas em comum nas três frações mais potentes representam as substâncias ativas na inibição do crescimento celular. Além disso, os componentes mais apolares presentes nas frações 3 e 4 e ausentes na fração 5 possivelmente não são responsáveis pela atividade antiproliferativa observada. Levando em conta os valores de TGI e a presença de um menor número de compostos, identificados pela CCD, a fração 5 foi escolhida para continuar o processamento bioguiado.

O fracionamento em coluna aberta com sílica fase reversa  $C_{18}$  foi uma metodologia adequada para o fracionamento da própolis, pois deu origem a 30 subfrações com atividades distintas, perfil químico com poucos compostos e características de polaridades diferentes. As subfrações escolhidas para dar continuidades aos fracionamentos químicos apresentaram alta atividade antiproliferativa, sendo citocida para as células avaliadas.

Nas cromatoplacas de CCD reveladas sob luz UV, pode-se observar diferentes bandas com tonalidades que variam entre azul claro e azul escuro, verde, amarelo, laranja e vermelho intenso. Esses tons são característicos de compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonoides e que variam de acordo com o tipo estrutural da molécula (Markham *et al.*, 1970; Makin, 1985). A CCD dos compostos obtidos pela coluna aberta com sílica fase reversa C<sub>18</sub> apresentaram bandas concentradas e distintas da fração 5. Esse resultado sugere que o fracionamento promoveu uma purificação da fração de origem.

De acordo com a técnica HPLC semi-preparativo, foi possível coletar 4 picos que corresponderam as subfrações 20.1, 20.2, 20.3 e 20.4, sendo que apenas as subfrações 20.1 e 20.3 apresentaram elevada potência inibitória do crescimento celular em função das concentrações empregadas, com atividade citocida nas maiores concentrações, menores valores de TGI e tendência de aumento de potência em relação ao EEPV. Essa diferença de atividade demonstra a eficiência da técnica de separação e a diferença no perfil químico dos compostos encontrados.

Tendo em vista o melhor rendimento e melhor atividade da subfração 20.3, ela foi testada nas linhagens de câncer de cólon (HT-29) e câncer de próstata (PC-3) apresentando atividade citostática e citocida nos diferentes tratamentos e tempos de exposição. A escolha desses dois tipos de câncer se deu pois sabe-se que processos inflamatórios estão envolvidos em todas as etapas de seu desenvolvimento. Dessa forma, o uso da própolis vermelha, que possui atividades anti-inflamatória e imunomoduladora conhecidas, seria uma abordagem inovadora na prevenção e tratamento desses tipos de câncer.

Os resultados obtidos a partir do fracionamento do EEPV estão de acordo com outros estudos que abordaram a atividade antiproliferativa *in vitro* da própolis vermelha. A atividade citotóxica dessa própolis foi avaliada em diferentes linhagens celulares, apresentando atividade antiproliferativa para o câncer de pâncreas (PANC-1) (Awale *et al.*, 2008), leucemia (K562, HL60), células de câncer de mama (MCF-7) (Kamiya *et al.* 2012), laringe (Hep-2),

colo do útero (HeLa) (Alencar *et al* 2007; Li *et al.* 2008; Frozza *et al.* 2013), glioblastoma (SF-295), ovário (OVCAR-8) e cólon (HCT-116) (de Mendonça *et al.* 2015)

Após as coletas dos picos acreditava-se que as subfrações estariam isoladas, entretanto, as amostras foram analisadas por HPLC analítico e foi possível observar que ainda haviam impurezas. A amostra foi então repurificada dando origem ao composto **1** que através da espectrometria de massas de alta resolução, RMN uni e bidimensionais mostrou um composto isolado.

Com dados obtidos por RMN do composto 1 foi possível uma busca na literatura para que esses valores fossem comparados a dados físico-químicos e espectrométricos dos flavonoides isolados. Não há relatos de valores semelhantes ao composto 1 porém, esse composto encontrado parece ser a união de dois compostos já descrito para a própolis. O composto que nos chamou atenção foi o vestitol (C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>), o qual foi isolado da Dalbergia odorífera (Zhao et al., 2011), da própolis cubana (Piccinelli at al., 2005) e da própolis vermelha brasileira (Oldoni et al., 2011). Esse composto pode ser comparado pois apresenta os seguintes dados reportados por Piccinelli *et al.*(2005): Vestitol:  $[\alpha]_D$  +5.02 (c 1.06, CH<sub>3</sub>OH); CD  $[\theta]_{239}$  3090.3,  $[\theta]_{289}$  -1639.4 (c 6.7 × 10<sup>4</sup> M, CH<sub>3</sub>OH); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ 6.84 (H-6'), 6.79 (H-5), 6.38 (H-3'), 6.32 (H-6), 6.28 (H-5'), 6.25 (H-8), 4.17 (H-2b), 3.83 (H-2a), 3.62 (MeO-4'), 3.40 (H-3), 2.81 (H-4a), 2.66 (H-4b); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 160.4 (C-4'), 156.9 (C-7), 156.7 (C-2'), 156.0 (C-9), 131.6 (C-5), 128.7 (C-6'), 121.5 (C-1'), 115.4 (C-10), 109.2 (C-6), 105.7 (C-5'), 103.6 (C-8), 101.7 (C-3'), 70.9 (C-2), 55.1 (MeO-4'), 32.7 (C-3), 31.0 (C-4); ESI-MS (modo positivo), *m/z* 273.2 [M + H]<sup>+</sup>; MS/MS, *m/z* 163.1, 137.1, 123.1. (2005). O composto 1 poderia ser a junção do vestitol com outro composto que também nos chamou atenção por semelhança com os dados encontrados, chamado benzofurano descrito por Clerici et al. (1990).

Através dos dados obtidos, pelos espectros de carbono e hidrogênio, analisamos os dados pelo programa ChemBioDraw Ultra que gerou uma previsão espectral, permitindo uma análise de uma estrutura teórica para o composto. Os dados obtidos através da técnica de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C estão na figura 21 sendo possível comparar a estrutura teórica com a estrutura proposta para o composto isolado através do RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e observar a semelhança entre os dados.



**Figura 21.** A) e C) Dados do programa ChemBioDraw Ultra que gerou uma previsão espectral, permitindo a análise de uma de estrutura teórica de  ${}^{13}$ C e  ${}^{1}$ H no composto. B) e D) Estrutura proposta para a composto **1** através de dados do RMN de  ${}^{13}$ C e  ${}^{1}$ H obtidos.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram referenciados ao sinal residual de DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$  2,49 ppm e  $\delta$  39,5 ppm) ou ao padrão interno de tetrametilsilano (TMS). O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **1** apresentou dois multipletos em  $\delta_{\rm H}$  4,05 e 3,67 (*m*,  $\delta_{\rm C}$  69,6) integrados para 1H cada e que baseados nos deslocamentos de RMN de <sup>13</sup>C foram conferidos aos hidrogênios carbinólicos H-2 (anel C), vizinhos de um centro estereogênicos. Também, foram observados dois dupletos em  $\delta_{\rm H}$  2,56 (*d*, *J* = 8,0 Hz,  $\delta_{\rm C}$  29,7) e  $\delta_{\rm H}$  3,86 (*d*, *J* = 2,6 Hz,  $\delta_{\rm C}$  22,7) integrados para 2H cada, os quais foram conferidos a H-4 (anel C) e ao grupo metileno isolado, além de dois sinpletos em  $\delta_{\rm H}$  3,65 (*s*,  $\delta_{\rm C}$  55,1) e  $\delta_{\rm H}$  3,75 (*s*,  $\delta_{\rm C}$  55,6) atribuídos a duas metilas ligadas diretamente à átomos de oxigênio.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C foi possível observar 25 sinais de carbono que associado ao mapa de correlação a longa distância de HMBC foi possível observar os 7 sinais de carbono restantes, o que permitiu atribuir a duas metilas carbinólicas, três carbonos metilênicos sendo um carbinólico, doze metínicos sendo onze benzílicos e, quinze quaternários sendo nove ligados diretamente à átomos de oxigênio (Tabela 11).

O sistema ABX do anel B foi estabelecido pela correlação a longa distância de HMBC entre H-6' (anel B,  $\delta_{\rm H}$  6,55) com C-3 (anel C,  $\delta_{\rm C}$  31,1), além das correlações observadas entre H-2 (anel C) com C-9 (anel A-C,  $\delta_{\rm C}$  154,8) e de H-4 (anel C) com C-10 (anel A-C,  $\delta_{\rm C}$  114,6) característico de um isoflavano heterocíclico.

Em extensão as atribuições acima, H-6' (anel B) mostrou correlação com o grupo metileno isolado em  $\delta_{\rm H}$  3,86 ( $\delta_{\rm C}$  22,7). Interações entre o grupo metileno isolado com os carbonos C-4' ( $\delta_{\rm C}$  153,7) e C-5' ( $\delta_{\rm C}$  116,8) do anel B juntamente com os carbonos C-2 ( $\delta_{\rm C}$ 148,6), C-3 ( $\delta_{\rm C}$  116,5) e C-9 ( $\delta_{\rm C}$  123,2) do anel F confirmou a ligação interflavanil, compreendendo o grupo metileno como ligação a partir de C-5' (anel B)  $\rightarrow$  C-3 (anel F).

Correlações de HMBC entre H-4 (anel D,  $\delta_{\rm H}$  7,17) e H-7 (anel D,  $\delta_{\rm H}$  7,02) com C-6 (anel D,  $\delta_{\rm C}$  157,0) e de H-5' (anel E,  $\delta_{\rm H}$  6,27) com C-4' (anel E,  $\delta_{\rm C}$  159,4) confirmaram a posição das duas metoxilas em C-6 (anel D) e C-4' (anel E). As correlações a longa distância entre H-4 (anel D) com C-3 (anel F,  $\delta_{\rm C}$  116,5), C-8 (anel D-F,  $\delta_{\rm C}$  154,7) e C-9 (anel D-F,  $\delta_{\rm C}$  123,2) e, de H-6' (anel E,  $\delta_{\rm C}$  132,0) com C-2 (anel F,  $\delta_{\rm C}$  148,6) e C-2' (anel E,  $\delta_{\rm C}$  156,5) confirmaram a segunda metade neoflavanoídica do composto dimérico.

A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono foi realizada após avaliação das interações a curta distância <sup>1</sup>J, no experimento bidimensional HMQC (Figura 22).



Figura 22. Composto 1 isolado e correlações <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a longa distância observada.

Pesquisas realizadas em diferentes bancos de dados, dentre eles o *Dictionary of Natural Products* e *SciFinder* indicam que o composto encontrado é **inédito na literatura** e pertencente a classe dos **isoflavonóides-neoflavonoides**. Esse composto será testado para potencial atividade antiproliferativa, ciclo e morte celular futuramente.

Os isoflavonoides estão presentes apenas em poucas espécies do reino vegetal quase que exclusivamente na família Fabaceae (Veitch *et al.*, 2013). Li *et al.* (2008) utilizaram várias classes de flavonoides isolados do extrato metanólico da própolis vermelha e observaram efeitos citotóxicos em linhagens de diferentes tipos de câncer (B16-BL6, LLC, A549, HT-1080) principalmente com o composto 7-hidroxi-6-metoxiflavanona. Nesse estudo observou-se que as isoflavanas, chalconas e pterocarpanos, flavonoides isolados do extrato metanólico da própolis vermelha brasileira, apresentaram potência variando de acordo com seus substituintes, como grupos metoxila ou hidroxila. Alguns desses compostos apresentaram atividade antiproliferativa comparável à dos fármacos anticancerígenos utilizados clinicamente. Em linhagem celular tumoral PANC-1 (pâncreas humano) o extrato metanólico da própolis vermelha, na concentração de 10 µg/mL, apresentou 100% de citotoxicidade, em meio com privação de nutrientes (Awale *et al.*, 2008).

Vários mecanismos têm sido propostos para o efeito de flavonoides sobre as fases de iniciação e promoção da carcinogênese, incluindo influências sobre o desenvolvimento e as atividades hormonais (De Amicis et al., 2013). Os principais mecanismos moleculares de ação dos flavonoides são: redução dos níveis da proteína p53 mutante, interrupção do ciclo celular, inibição da tirosina quinase, inibição das proteínas de choque térmico (heat-shock proteins), capacidade de ligação ao receptor de estrogênio, inibição da expressão de proteínas Ras (Kumar & Pandey, 2013). Além disso, os flavonoides possuem reconhecida função imunomoduladora. Diversos membros da classe dos flavonoides afetam significativamente a função do sistema imune e de células inflamatórias (Zhou et al., 2016). Os flavonoides são capazes de inibir a expressão das isoformas presentes na síntese do óxido nítrico, ciclooxigenase e lipoxigenase, que são responsáveis pela produção prostaglandinas e leucotrienos, envolvidos na sinalização para produção de uma grande quantidade de mediadores do processo inflamatório, tais como citocinas, quimiocinas ou moléculas de adesão (Tunon et al., 2009). Grande parte do efeito anti-inflamatório dos flavonoides é devido a inibição da biossíntese de citocinas que medeiam a adesão de leucócitos em circulação para locais de lesão (Kumar & Pandey, 2013).

Os resultados apresentados aqui sugerem que tanto o EEPV quanto suas frações e subfrações não apresentam seletividade para uma linhagem tumoral específica, o que indica que seus efeitos são direcionados a um processo tumoral comum a diferentes tipos de tumor. A prevenção do desenvolvimento de tumores através do consumo de produtos ricos em

polifenóis, em especial flavonoides, é um assunto bastante discutido e comprovado cientificamente (Amin *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Além disso, a boa biodisponibilidade por via oral e bom perfil histórico de segurança torna a própolis um agente adjuvante potencial a ser usado na terapia e prevenção do câncer.

Nossos resultados suportam a hipótese de que o composto inédito encontrado nesse estudo tem participação na atividade antiproliferativa da própolis vermelha brasileira . Sabendo que a própolis vermelha é uma fonte de substâncias bioativas, o composto encontrado pode ser útil por si só ou em combinação com terapias convencionais para a prevenção da progressão e/ou tratamento de câncer.

### Referências

Alencar, S.M., Oldoni, T.L., Castro, M.L., Cabral, I.S., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of ethnopharmacology 113(2), 278-283.

Amin, A.R., Kucuk, O., Khuri, F.R., Shin, D.M., 2009. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 27(16), 2712-2725.

Awale, S., Li, F., Onozuka, H., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. Bioorganic & medicinal chemistry 16(1), 181-189.

Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L., 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. Journal of agricultural and food chemistry 61(19), 4546-4550.

Chan, G.C., Cheung, K.W., Sze, D.M., 2013. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. Clinical reviews in allergy & immunology 44(3), 262-273.

Clerici, A., Porta, O., Arnone, A., 1990. Reduction of o-hydroxybenzaldehydes by aqueous titanium trichloride. A new route to 2-(benzofuran-2-yl)phenols. The Journal of Organic Chemistry 55(4), 1240-1248.

Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., 2014. New horizons for old drugs and drug leads. Journal of natural products 77(3), 703-723.

Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et biophysica acta 1830(6), 3670-3695.

De Amicis, F., Russo, A., Avena, P., Santoro, M., Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Mauro, L., Aquila, S., Tramontano, D., Fuqua, S.A., Ando, S., 2013. In vitro mechanism for downregulation of ER-alpha expression by epigallocatechin gallate in ER+/PR+ human breast cancer cells. Molecular nutrition & food research 57(5), 840-853.

de Mendonca, I.C., Porto, I.C., do Nascimento, T.G., de Souza, N.S., Oliveira, J.M., Arruda, R.E., Mousinho, K.C., dos Santos, A.F., Basilio-Junior, I.D., Parolia, A., Barreto, F.S., 2015. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. BMC complementary and alternative medicine 15, 357.

Feng, G., Sun, B., Li, T.Z., 2015. Daidzein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway. International immunopharmacology 26(2), 392-400.

Franchi, G.C., Moraes, C.S., Toreti, V.C., Daugsch, A., Nowill, A.E., Park, Y.K., 2012. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012, 6.

Freires, I.A., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2016. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. European journal of medicinal chemistry 110, 267-279.

Frozza, C.O., Garcia, C.S., Gambato, G., de Souza, M.D., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Roesch-Ely, M., 2013. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 52, 137-142.

Kaidama, W.M., Gacche, R.N., 2015. Anti-Inflammatory Activity of Quercetin in Acute and Chronic Phases of Inflammation in Guinea Pigs. Advanced Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics 3, 129-136.

Kamiya, T., Nishihara, H., Hara, H., Adachi, T., 2012. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. Journal of agricultural and food chemistry 60(44), 11065-11070.

Kole, L., Giri, B., Manna, S.K., Pal, B., Ghosh, S., 2011. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFkappaB nuclear translocation. European journal of pharmacology 653(1-3), 8-15.

Kristo, A.S., Klimis-Zacas, D., Sikalidis, A.K., 2016. Protective Role of Dietary Berries in Cancer. Antioxidants 5(4).

Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. TheScientificWorldJournal 2013, 162750.

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. Bioorganic & medicinal chemistry 16(10), 5434-5440.

Longato, G.B., Fiorito, G.F., Vendramini-Costa, D.B., de Oliveira Sousa, I.M., Tinti, S.V., Ruiz, A.L., de Almeida, S.M., Padilha, R.J., Foglio, M.A., de Carvalho, J.E., 2015. Different cell death responses induced by eupomatenoid-5 in MCF-7 and 786-0 tumor cell lines. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 29(5), 1026-1033.

Makin, H.L.J., 1985. Plant Drug Analysis - a Thin-Layer Chromatography Atlas - Wagner, H, Bladt, S, Zgainski, Em. Med Sci Law 25(3), 235-235.

Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., Lu, Y.R., 1996. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. Phytochemistry 42(1), 205-211.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., et al., 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen

using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. Journal of the National Cancer Institute 83(11), 757-766.

Oldoni, T.L.C., Cabral, I.S.R., d'Arce, M.A.B.R., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., Nascimento, A.M., Alencar, S.M., 2011. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. Separation and Purification Technology 77, 208-213.

Piccinelli, A.L., Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Marquez Hernandez, I., De Simone, F., Rastrelli, L., 2005. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. Journal of agricultural and food chemistry 53(23), 9010-9016.

Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. Journal of the science of food and agriculture 91(13), 2363-2370.

Sena-Lopes, A., Bezerra, F.S.B., das Neves, R.N., de Pinho, R.B., Silva, M.T.O., Savegnago, L., Collares, T., Seixas, F., Begnini, K., Henriques, J.A.P., Ely, M.R., Rufatto, L.C., Moura, S., Barcellos, T., Padilha, F., Dellagostin, O., Borsuk, S., 2018. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. PloS one 13(2), e0191797.

Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 5(3), 313-316.

Szliszka, E., Krol, W., 2013. Polyphenols Isolated from Propolis Augment TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2013, 731940.

Tunon, M.J., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Gonzalez-Gallego, J., 2009. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. Current drug metabolism 10(3), 256-271.

Valenca, I., Morais-Santos, F., Miranda-Goncalves, V., Ferreira, A.M., Almeida-Aguiar, C., Baltazar, F., 2013. Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. BMC complementary and alternative medicine 13, 184.

Veitch, N.C., 2013. Isoflavonoids of the leguminosae. Natural product reports 30(7), 988-1027.

Yang, C.S., Wang, X., Lu, G., Picinich, S.C., 2009. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. Nature reviews. Cancer 9(6), 429-439.

Zhao, X., Mei, W., Gong, M., Zuo, W., Bai, H., Dai, H., 2011. Antibacterial activity of the flavonoids from Dalbergia odorifera on Ralstonia solanacearum. Molecules 16(12), 9775-9782.

Zhou, L., Xu, N., Sun, Y., Liu, X.M., 2014. Targeted biopharmaceuticals for cancer treatment. Cancer letters 352(2), 145-151.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Nesse estudo foram avaliadas as atividades antitumorais e anti-inflamatórias do extrato etanólico da Própolis Vermelha Brasileira (EEPV), um produto único da região Nordeste do Brasil e através do fracionamento bioguiado foi possível o isolamento e determinação estrutural de uma molécula inédita, aqui descrita pela primeira vez na literatura.

Através dos estudos *in vitro* em diferentes linhagens tumorais humanas foi possível notar que o EEPV inibiu o crescimento celular de maneira dependente da concentração, sem seletividade para um tipo tumoral, o que indica que seus efeitos são direcionados a um processo tumoral comum a diferentes tipos de tumor. Na linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3) o EEPV inibiu a proliferação celular induzindo a interrupção do ciclo celular na fase G1, provavelmente provocando um efeito citostático antes da morte celular. Além disso, foi possível observar que o EEPV atua induzindo apoptose e necroptose, o que é um mecanismo promissor para novas abordagens terapêuticas pois pode evitar mecanismos de resistência.

Através de nossos estudos inéditos *in vivo* mostramos que o consumo oral de PVB, da mesma forma que é utilizado popularmente, possui efeito sistêmico sendo capaz de diminuir o crescimento do tumor sólido de Ehrlich nas três doses testadas. Nos animais TRAMP, retardou a progressão do adenocarcinoma prostático, efeito evidenciado pela menor frequência de HGPIN, maior frequência de ácinos normais, redução significativa da proliferação de células epiteliais, indução de apoptose e redução da expressão de COX-2 por essas células, proporcionando um ambiente tumoral menos agressivo e corroborando os resultados encontrados em modelos de inflamação. O EEPV apresentou atividade dose-dependente no edema de pata induzido por carragenina, inibindo a formação de edema desde as primeiras horas até o final do experimento. O pré-tratamento com EEPV inibiu significativamente a formação de edema de pata induzida pelos compostos 48/80, bradicinina e PGE2 e a inibição da ativação de neutrófilos foi confirmada pelo edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

Estes resultados indicam EEPV como um agente a ser explorado para potencial uso em terapias combinatórias para modulação de processos inflamatórios agudos ou crônicos e potencialmente na prevenção da progressão do tumor de próstata, inibindo a inflamação, a proliferação e induzindo a morte celular. Além disso, sua característica multi-alvo (antiinflamatório, indução de diferentes tipos de morte celular) é uma característica importante que pode superar os mecanismos de resistência e evasão de morte celular.

# **REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO**

Alencar, S.M., Oldoni, T.L., Castro, M.L., Cabral, I.S., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of ethnopharmacology 113(2), 278-283.

Apaya, M.K., Chang, M.T., Shyur, L.F., 2016. Phytomedicine polypharmacology: Cancer therapy through modulating the tumor microenvironment and oxylipin dynamics. Pharmacology & therapeutics 162, 58-68.

Araujo, M.A.R., Libério, S.A., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F. R. F., 2012. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. Brazilian Journal of Pharmacognosy 22, 208-219.

Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology advances 33(8), 1582-1614.

Awale, S., Li, F., Onozuka, H., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. Bioorganic & medicinal chemistry 16(1), 181-189.

Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., 2001. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology 8(1), 16-23.

Barbosa Bezerra, G., de Menezes de Souza, L., Dos Santos, A.S., de Almeida, G.K., Souza, M.T., Santos, S.L., Aparecido Camargo, E., Dos Santos Lima, B., de Souza Araujo, A.A., Cardoso, J.C., Gomes, S.V., Gomes, M.Z., de Albuquerque, R.L.J., 2017. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 85, 687-696.

Batista, L.L.V., Mella, E.A.C., Assis, M.L.B., Barbosa, A.P.F., Grillo, L.A.M., Dornelas, C.B., 2012. Comparative study of topical Green and red própolis in the repair of wound induced in rats. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões 39, 515-520.

Berman-Booty, L.D., Sargeant, A.M., Rosol, T.J., Rengel, R.C., Clinton, S.K., Chen, C.S., Kulp, S.K., 2012. A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice. Toxicologic pathology 40(1), 5-17.

Berquin, I.M., Min, Y., Wu, R., Wu, H., Chen, Y.Q., 2005. Expression signature of the mouse prostate. The Journal of biological chemistry 280(43), 36442-36451.

Berretta, A., Arruda, C., Galeti Miguel, F., Baptista, N., Piacezzi Nascimento, A., Marquele-Oliveira, F., Issa Hori, J., Barud, H., Damaso, B., Ramos, C., Ferreira, R., Bastos, J., 2017. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market.

Bettendorf, O., Schmidt, H., Staebler, A., Grobholz, R., Heinecke, A., Boecker, W., Hertle, L., Semjonow, A., 2008. Chromosomal imbalances, loss of heterozygosity, and immunohistochemical expression of TP53, RB1, and PTEN in intraductal cancer,

intraepithelial neoplasia, and invasive adenocarcinoma of the prostate. Genes, chromosomes & cancer 47(7), 565-572.

Bianchi-Frias, D., Basom, R., Delrow, J.J., Coleman, I.M., Dakhova, O., Qu, X., Fang, M., Franco, O.E., Ericson, N.G., Bielas, J.H., Hayward, S.W., True, L., Morrissey, C., Brown, L., Bhowmick, N.A., Rowley, D., Ittmann, M., Nelson, P.S., 2016. Cells Comprising the Prostate Cancer Microenvironment Lack Recurrent Clonal Somatic Genomic Aberrations. Molecular cancer research : MCR 14(4), 374-384.

Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L., 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. Journal of agricultural and food chemistry 61(19), 4546-4550.

Bueno-Silva, B., Franchin, M., Alves, C.F., Denny, C., Colon, D.F., Cunha, T.M., Alencar, S.M., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L., 2016. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology 23(13), 1583-1590.

Chai, E.Z., Siveen, K.S., Shanmugam, M.K., Arfuso, F., Sethi, G., 2015. Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. The Biochemical journal 468(1), 1-15.

Chan, G.C., Cheung, K.W., Sze, D.M., 2013. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. Clinical reviews in allergy & immunology 44(3), 262-273.

Chiaverotti, T., Couto, S.S., Donjacour, A., Mao, J.H., Nagase, H., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., Balmain, A., 2008. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. The American journal of pathology 172(1), 236-246.

Chuu, C.P., Lin, H.P., Ciaccio, M.F., Kokontis, J.M., Hause, R.J., Jr., Hiipakka, R.A., Liao, S., Jones, R.B., 2012. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. Cancer prevention research 5(5), 788-797.

Correa, F.R., Schanuel, F.S., Moura-Nunes, N., Monte-Alto-Costa, A., Daleprane, J.B., 2017. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFkappaB. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 86, 162-171.

Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., 2014. New horizons for old drugs and drug leads. Journal of natural products 77(3), 703-723.

Cragg, G.M., Newman, D.J., 2009. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. Phytochemistry Reviews 8, 313-331.

Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et biophysica acta 1830(6), 3670-3695.

Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Cooke, P.S., Mee, S., Bigsby, R.M., Higgins, S.J., Sugimura, Y., 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. Endocrine reviews 8(3), 338-362.

Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., 2002. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. Differentiation; research in biological diversity 70(9-10), 473-485.

das Neves, M.V., da Silva, T.M., Lima Ede, O., da Cunha, E.V., Oliveira Ede, J., 2016. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against Candida sp. Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology] 47(1), 159-166.

de Mendonca, I.C., Porto, I.C., do Nascimento, T.G., de Souza, N.S., Oliveira, J.M., Arruda, R.E., Mousinho, K.C., dos Santos, A.F., Basilio-Junior, I.D., Parolia, A., Barreto, F.S., 2015. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. BMC complementary and alternative medicine 15, 357.

Feng, G., Sun, B., Li, T.Z., 2015. Daidzein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway. International immunopharmacology 26(2), 392-400.

Fernandes, P.D., Guerra, F.S., Sales, N.M., Sardella, T.B., Jancar, S., Neves, J.S., 2015. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. Journal of pharmacological and toxicological methods 71, 83-89.

Franchin, M., Colon, D.F., Castanheira, F.V., da Cunha, M.G., Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Cunha, T.M., Rosalen, P.L., 2016. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. Journal of natural products 79(4), 954-960.

Franchin, M., Freires, I.A., Lazarini, J.G., Nani, B.D., da Cunha, M.G., Colon, D.F., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2018. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. European journal of medicinal chemistry 153, 49-55.

Freires, I.A., de Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2016. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. European journal of medicinal chemistry 110, 267-279.

Frozza, C., Santos, D.A., Rufatto, L.C., Minetto, L., Scariot, F.J., Echeverrigaray, S., Pich, C.T., Moura, S., Padilha, F.F., Borsuk, S., Savegnago, L., Collares, T., Seixas, F.K., Dellagostin, O., Roesch-Ely, M., Henriques, J.A.P., 2017. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 91, 951-963.

Frozza, C.O., Ribeiro Tda, S., Gambato, G., Menti, C., Moura, S., Pinto, P.M., Staats, C.C., Padilha, F.F., Begnini, K.R., de Leon, P.M., Borsuk, S., Savegnago, L., Dellagostin, O., Collares, T., Seixas, F.K., Henriques, J.A., Roesch-Ely, M., 2014. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 63, 195-204.

Gingrich, J.R., Greenberg, N.M., 1996. A transgenic mouse prostate cancer model. Toxicologic pathology 24(4), 502-504.

Greenberg, N.M., DeMayo, F., Finegold, M.J., Medina, D., Tilley, W.D., Aspinall, J.O., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Matusik, R.J., Rosen, J.M., 1995. Prostate cancer in a transgenic mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(8), 3439-3443.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. Cell 140(6), 883-899.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. Cell 100(1), 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144(5), 646-674.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S., 2014. Drug resistance in cancer: an overview. Cancers 6(3), 1769-1792.

IARC (International Agency for Research on Cancer). World Health Organization. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, and mortality and prevalence worldwide in 2012: cancer fact sheets. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Default.aspx. Acesso em 23 de junho de 2018.

INCA (Instituto Nacional De Câncer). Rio de Janeiro, 2018. Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2018. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa. Acesso em: 20 de maio de 2018.

Jung, W.K., Choi, I., Lee, D.Y., Yea, S.S., Choi, Y.H., Kim, M.M., Park, S.G., Seo, S.K., Lee, S.W., Lee, C.M., Park, Y.M., Choi, I.W., 2008. Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages via the p38/ERK and NF-kappaB pathways. The international journal of biochemistry & cell biology 40(11), 2572-2582.

Kaidama, W.M., Gacche, R.N., 2015. Anti-Inflammatory Activity of Quercetin in Acute and Chronic Phases of Inflammation in Guinea Pigs. Advanced Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics 3, 129-136.

Kamiya, T., Nishihara, H., Hara, H., Adachi, T., 2012. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. Journal of agricultural and food chemistry 60(44), 11065-11070.

Karin, M., Greten, F.R., 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nature reviews. Immunology 5(10), 749-759.

Kim, J.Y., Park, S.J., Yun, K.J., Cho, Y.W., Park, H.J., Lee, K.T., 2008. Isoliquiritigenin isolated from the roots of Glycyrrhiza uralensis inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. European journal of pharmacology 584(1), 175-184.

Kundu, J.K., Surh, Y.J., 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. Free radical biology & medicine 52(9), 2013-2037.

Leav, I., Lau, K.M., Adams, J.Y., McNeal, J.E., Taplin, M.E., Wang, J., Singh, H., Ho, S.M., 2001. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. The American journal of pathology 159(1), 79-92.

Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. Bioorganic & medicinal chemistry 16(10), 5434-5440.

Li, H., Kapur, A., Yang, J.X., Srivastava, S., McLeod, D.G., Paredes-Guzman, J.F., Daugsch, A., Park, Y.K., Rhim, J.S., 2007. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. International journal of oncology 31(3), 601-606.

Li, Z., Dong, X., Zhang, J., Zeng, G., Zhao, H., Liu, Y., Qiu, R., Mo, L., Ye, Y., 2014. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. Journal of the neurological sciences 338(1-2), 112-117.
Lima Cavendish, R., de Souza Santos, J., Belo Neto, R., Oliveira Paixao, A., Valeria Oliveira, J., Divino de Araujo, E., Berretta, E.S.A.A., Maria Thomazzi, S., Cordeiro Cardoso, J., Zanardo Gomes, M., 2015. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. Journal of ethnopharmacology 173, 127-133.

Lin, H.P., Jiang, S.S., Chuu, C.P., 2012. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. PloS one 7(2), e31286.

Lin, H.P., Lin, C.Y., Liu, C.C., Su, L.C., Huo, C., Kuo, Y.Y., Tseng, J.C., Hsu, J.M., Chen, C.K., Chuu, C.P., 2013. Caffeic Acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting akt signaling. International journal of molecular sciences 14(3), 5264-5283.

Machado, B.A., Silva, R.P., Barreto Gde, A., Costa, S.S., Silva, D.F., Brandao, H.N., Rocha, J.L., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Umsza-Guez, M.A., Padilha, F.F., 2016. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. PloS one 11(1), e0145954.

McNeal, J.E., 1988. Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinoma. Seminars in ultrasound, CT, and MR 9(5), 329-334.

Nani, B.D., Franchin, M., Lazarini, J.G., Freires, I.A., da Cunha, M.G., Bueno-Silva, B., de Alencar, S.M., Murata, R.M., Rosalen, P.L., 2018. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. Phytotherapy research : PTR 32(4), 750-754.

NCI (Nacional cancer institute).EUA, 2018. Cancer Statistics. Disponível em https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics. Acesso em: 25 de maio de 2018.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of natural products 79(3), 629-661.

Novak, E.M., Silva, M.S.E.C., Marcucci, M.C., Sawaya, A.C.H.F., Lopez, B.G.C., Fortes, M.A.H.Z., Giorgi, R.R., Marumo, K.T., Rodrigues, R.F., Maria, D.A., 2014. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. J Funct Foods 11, 91-102.

Oryan, A., Alemzadeh, E., Moshiri, A., 2018. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 98, 469-483.

Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., Shimizu, M.T., 2001. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. Mycoses 44(9-10), 375-378.

Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. Journal of agricultural and food chemistry 50(9), 2502-2506.

Park, Y.K., Koo, M.H., Abreu, J.A., Ikegaki, M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Current microbiology 36(1), 24-28.

Paulino, N., Abreu, S.R., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Scremin, A., Bretz, W.A., 2008. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. European journal of pharmacology 587(1-3), 296-301.

Pinheiro, K.S., Ribeiro, D.R., Alves, A.V., Pereira-Filho, R.N., Oliveira, C.R., Lima, S.O., Reis, F.P., Cardoso, J.C., Albuquerque-Junior, R.L., 2014. Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. Acta cirurgica brasileira 29(2), 111-117.

Pippi, B., Lana, A.J., Moraes, R.C., Guez, C.M., Machado, M., de Oliveira, L.F., Lino von Poser, G., Fuentefria, A.M., 2015. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on Candida spp. Journal of applied microbiology 118(4), 839-850.

Regueira, M.S.N., Tintino, S.R., da Silva, A.R.P., Costa, M.D.S., Boligon, A.A., Matias, E.F.F., de Queiroz Balbino, V., Menezes, I.R.A., Melo Coutinho, H.D., 2017. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 107(Pt B), 572-580.

Ribeiro, D.R., Alves, A.V., dos Santos, E.P., Padilha, F.F., Gomes, M.Z., Rabelo, A.S., Cardoso, J.C., Massarioli, A.P., de Alencar, S.M., de Albuquerque-Junior, R.L., 2015. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. Basic & clinical pharmacology & toxicology 117(2), 85-95.

Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. Journal of the science of food and agriculture 91(13), 2363-2370.

Righi, A.A., Negri, G., Salatino, A., 2013. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2013, 267878.

Sawicka, D., Car, H., Borawska, M.H., Niklinski, J., 2012. The anticancer activity of propolis. Folia histochemica et cytobiologica 50(1), 25-37.

Sena-Lopes, A., Bezerra, F.S.B., das Neves, R.N., de Pinho, R.B., Silva, M.T.O., Savegnago, L., Collares, T., Seixas, F., Begnini, K., Henriques, J.A.P., Ely, M.R., Rufatto, L.C., Moura, S., Barcellos, T., Padilha, F., Dellagostin, O., Borsuk, S., 2018. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. PloS one 13(2), e0191797.

Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? Journal of ethnopharmacology 133(2), 253-260.

Shappell, S.B., Thomas, G.V., Roberts, R.L., Herbert, R., Ittmann, M.M., Rubin, M.A., Humphrey, P.A., Sundberg, J.P., Rozengurt, N., Barrios, R., Ward, J.M., Cardiff, R.D., 2004. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. Cancer research 64(6), 2270-2305.

Shen, M.M., Abate-Shen, C., 2010. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. Genes & development 24(18), 1967-2000.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2018. Cancer statistics, 2018. CA: a cancer journal for clinicians 68(1), 7-30.

Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 5(3), 313-316.

Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., Krol, W., 2011. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. International journal of oncology 38(4), 941-953.

Szliszka, E., Zydowicz, G., Mizgala, E., Krol, W., 2012. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. International journal of oncology 41(3), 818-828.

Takahashi, A., Inoue, H., Mishima, K., Ide, F., Nakayama, R., Hasaka, A., Ryo, K., Ito, Y., Sakurai, T., Hasegawa, Y., Saito, I., 2015. Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. PloS one 10(1), e0116008.

Toorians, A.W., Kelleher, S., Gooren, L.J., Jimenez, M., Handelsman, D.J., 2003. Estimating the contribution of the prostate to blood dihydrotestosterone. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 88(11), 5207-5211.

Tunon, M.J., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., Gonzalez-Gallego, J., 2009. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. Current drug metabolism 10(3), 256-271.

Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Rowley, D.R., 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. The Journal of urology 166(6), 2472-2483.

Vendramini-Costa, D.B., Carvalho, J.E., 2012. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. Current pharmaceutical design 18(26), 3831-3852.

Vynograd, N., Vynograd, I., Sosnowski, Z., 2000. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology 7(1), 1-6.

Wang, Y., Zhu, Y., Gao, L., Yin, H., Xie, Z., Wang, D., Zhu, Z., Han, X., 2012. Formononetin attenuates IL-1beta-induced apoptosis and NF-kappaB activation in INS-1 cells. Molecules 17(9), 10052-10064.

Watanabe, M.A., Amarante, M.K., Conti, B.J., Sforcin, J.M., 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. The Journal of pharmacy and pharmacology 63(11), 1378-1386.

Wu, W.Y., Wu, Y.Y., Huang, H., He, C., Li, W.Z., Wang, H.L., Chen, H.Q., Yin, Y.Y., 2015. Biochanin A attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses and inhibits the activation of the MAPK pathway in BV2 microglial cells. International journal of molecular medicine 35(2), 391-398.

Zhang J, Wang L, Zhang Y, Li L, Higgins L, Lu J. Lobe-specific proteome changes in the dorsal-lateral and ventral prostate of TRAMP mice versus wild-type mice. Proteomics. 2011;11(12):2542-9.

Zhou, L., Xu, N., Sun, Y., Liu, X.M., 2014. Targeted biopharmaceuticals for cancer treatment. Cancer letters 352(2), 145-151.

Zizic, J.B., Vukovic, N.L., Jadranin, M.B., Andelkovic, B.D., Tesevic, V.V., Kacaniova, M.M., Sukdolak, S.B., Markovic, S.D., 2013. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. Journal of the science of food and agriculture 93(12), 3001-3009.

## ANEXOS





## INFORMAÇÃO

Informamos que a Tese de Doutorado intitulada Atividade anticâncer e anti-inflamatória da própolis vermelha e de seus compostos bioativos, de responsabilidade do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e Thais Petrochelli Banzato, foi desenvolvida a partir dos resultados obtidos nos protocolos CEUA:

3922-1 - Avaliação da toxicidade aguda, atividade antitumoral e anti inflamatória da própolis vermelha, sua frações e seus compostos bioativos, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho/Thais Petrochelli Banzato

3992-1 - Avaliação da toxicidade aguda, atividade antitumoral preventiva e anti inflamatória da própolis vermelha, sua frações e seus compostos bioativos, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho/Thais Petrochelli Banzato

4178-1 - Caracterização da biologia estrutural e molecular da próstata de camundongos transgênicos para adenocarcinoma de próstata (TRAMP) tratados com própolis vermelha no estágio inicial de desenvolvimento do tumor, Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete/Thais Petrochelli Banzato

4179-1 - Atividade da própolis vermelha em modelos de inflamação, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho/Thais Petrochelli Banzato

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Coordenador

Campinas, 11 de abril de 2018.

NT Fátima Alonso

Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

## Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congresso sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado, intitulada Atividade anticâncer e anti-inflamatória da própolis vermelha e de seus compostos bioativos, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 12 de Julho de 2018

Assinatura: Shays P. Banzas

Nome da autora: Thais Petrochelli Banzato

RG nº 34657609-X

Nome do orientador: João Ernesto de Carvalho

RG nº4335875

Assinatura