Martha Silveira e Costa Silva

Estudo do efeito da fração BRVD obtida a
partir da própolis brasileira tipificada, na
proliferação de células tumorais

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Dra. Estela Maria Novak

São Paulo
2007

Dedico este trabalho especialmente a:

Josué Borges da Costa e Carmen Silveira Borges da Costa

Meus pais, pelos ensinamentos de vida, dedicação e amor.

Adriano e Fernanda, Ricardo e Gustavo Bauer Costa da Silva

Meus filhos e nora, pelo carinho, ajuda e incentivo aos meus ideais.

Márcia e Mônica Silveira e Costa

Minhas irmãs, pela solidariedade e companheirismo.

Carlos, Daniel, Beatriz, Juliana e Melissa

Meus sobrinhos, agradeço por fazerem parte de minha vida.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, pelo empenho, pela dedicação e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa na Superintendência de Pesquisa da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo.
- À Dra. Estela Maria Novak, a quem devo pela orientação, pela confiança, pela disposição, pelo empenho e oportunidade de concluir esse trabalho.
- Ao Dr. Durvanei Augusto Maria, pelo auxílio, pelas valiosas críticas e sugestões na avaliação desta dissertação.
- Aos colegas da Superintendência de Pesquisa da Fundação Pró-Sangue, que colaboraram para a realização deste trabalho.
- Aos colegas do Laboratório de Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda, paciência e colaboração.
- Ao colega Giovani Marino Favero, pela imensa dedicação e sugestões destinadas ao auxílio para conclusão desta dissertação.
- À colega Ana Carolina de Oliveira, pela solidariedade e companheirismo.

- À Dra. Maria Cristina Marcucci, pelas importantes sugestões relacionadas aos compostos químicos.
- Ao Prof. Dr. Israel Bendit, pela compreensão e colaboração.
- Aos meus familiares, aos colegas e amigos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.
- Às minhas amigas Lúcia e Zuleica, pela atenção e ajuda na parte de impressão gráfica.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Própolis	1
1.2	Composição Química da Própolis.....	2
1.3.	Características Gerais da Própolis Brasileira.....	4
1.4.	Composição Química da Própolis Brasileira Vermelha.....	5
1.4.1	Fração BRVD da própolis vermelha (BRV).....	11
1.5	Atividades Biológicas da Própolis.....	12
1.6	Mecanismos da Inibição da Proliferação celular em Tumores Malignos.....	15
1.6.1.	Morte Celular.....	16
1.6.1.1	Morte por Apoptose	19
1.6.1.2	Morte por Autofagia	21
1.6.1.3	Morte por Necrose	23
1.6.2	Bloqueio do Ciclo Celular.....	26
2	OBJETIVO	29
3	MÉTODOS	30
3.1	Própolis Vermelha de Alagoas (BRV).....	30
3.2	Linhagens de Células.....	30
3.3	Cultura de células.....	30
3.4	Avaliação dos efeitos citotóxicos das frações A – F da própolis vermelha de Alagoas (BRV) em células B16F10 após 24 horas de tratamento.....	31
3.5	Estudo da Citotoxicidade da BRVD em linhagens Celulares.....	32
3.6	Avaliação da viabilidade - método de exclusão pelo Azul de Tripan.....	33
3.7	Avaliação por Citometria de Fluxo	34
3.7.1	Avaliação das fases do ciclo celular e da fragmentação do ADN (Iodeto de Propídio).....	34
3.7.2	Avaliação de Apoptose pela Determinação da Fosfatidilserina(Anexina V.....	34
3.8	Concentração Inibitória 50% (IC ₅₀) e Capacidade Inibitória da Proliferação Celular.....	35
3.9	Análise Estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Avaliação dos efeitos citotóxicos das frações A - F em célula de melanoma murino (B16F10) após 24 horas de tratamento.....	37

4.2	Estudo da Citotoxicidade da BRVD em linhagens celulares Tumerais.....	47
4.2.1	Células de Melanoma murino – B16F10.....	47
4.2.2	Células de Mieloma múltiplo – RPMI 8226.....	53
4.2.3	Células de Leucemia promielocítica – HL60.....	57
4.2.4	Células de Leucemia mielóide crônica - K562.....	63
4.2.5	Fibroblastos de prepúcio humano – FP.....	69
4.2.6	Fibroblastos de pulmão humano MCR-5.....	73
4.3	Aspectos Morfológicos das células de Melanoma Murino (B16F10) ,Leucemia Promielocítica (HL60) e Fibroblastos de prepúcio humano (FP).....	78
4.4	Avaliação por Citometria de Fluxo.....	86
4.4.1	Avaliação das fases do ciclo celular e da Fragmentação do A DN.....	86
4.4.1.1	Células de Melanoma Murino – B16F10.....	86
4.4.1.2	Células de leuc. promielocítica - HL60.....	98
4.4.1.3	Células de leuc. mielóide crônica - K562.....	109
4.4.2	Expressão do fosfolípido (Fosfatidilserina – AnexinaV) na membrana celular para a determinação das células Apoptóticas.....	117
4.4.2.1	Expressão do fosfolípido (Fosfatidilserina – Anexina V) na membrana em células HL60.	117
4.4.2.2	Expressão do fosfolípido (Fosfatidilserina – AnexinaV) na membrana em células K562.....	120
5	DISCUSSÃO.....	123
6	CONCLUSÕES.....	128
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Citotoxicidade das frações da Própolis Vermelha de Alagoas (BRV).....	37
Tabela 2 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da BRV.....	39
Tabela 3 - Viabilidade das células de melanoma murino - B16F10 à BRVD.....	48
Tabela 4 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da BRVD em B16F10.....	48
Tabela 5 - Viabilidade das células de mieloma múltiplo - RPMI 8226 À BRVD.....	53
Tabela 6 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da fração BRVD em RPMI 8226.....	54
Tabela 7 - Viabilidade das células de leucemia promielocítica HL60 à BRVD.....	58
Tabela 8 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular das células HL60 à BRVD.....	58
Tabela 9 - Viabilidade das células de leucemia mielóide crônica K562 a BRVD.....	64
Tabela 10 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular das células K562 à BRVD.....	64
Tabela 11 - Viabilidade dos fibroblastos de prepúcio humano – FP à BRVD.....	69
Tabela 12 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular dos fibroblastos FP à BRVD.....	70
Tabela 13 - Viabilidade dos fibroblastos MCR-5 à BRVD.....	74
Tabela 14 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular dos Fibroblastos MCR-5 à BRVD.....	74
Tabela 15 - Ciclo celular de células B16F10 incubadas 24h com a BRVD.....	88
Tabela 16 - Porcentagem das células B16F10 no ciclo celular após 24h com a BRVD.....	88
Tabela 17 - Ciclo celular de células B16F10 incubadas 48 h com a BRVD.....	91
Tabela 18 - Porcentagem das células B16F10 no ciclo celular após 48h com a BRVD.....	91
Tabela 19 - Ciclo celular de células B16F10 incubadas 72h com a BRVD.....	94
Tabela 20 - Porcentagem das células B16F10 no ciclo celular após 72h com a BRVD.....	94
Tabela 21 - Ciclo celular de células HL60 incubadas por 24h com a BRVD.....	99
Tabela 22 - Porcentagem das células HL60 no ciclo celular após 24h com a BRVD.....	99

Tabela 23 - Ciclo celular das células HL60 incubadas por 48h com a BRVD.....	102
Tabela 24 - Porcentagem das células HL60 no ciclo celular após 48hcom a BRVD.....	102
Tabela 25 - Ciclo celular das células HL60 incubadas por 72h com a BRVD.....	105
Tabela 26 - Porcentagem das células HL60 no ciclo celular após 72h com a BRVD.....	105
Tabela 27 - Ciclo celular das células K562 incubadas por 24h com a BRVD.....	110
Tabela 28 - Porcentagem das células K562 no ciclo celular após 24h com a BRVD.....	110
Tabela 29 - Ciclo celular das células K562 incubadas por 48h com a BRVD.....	113
Tabela 30 - Porcentagem das células K562 no ciclo celular após 48h com a BRVD.....	113
Tabela 31 - Morte celular por apoptose e necrose das células HL60 pelo ensaio com Anexina V.....	118
Tabela 32 - Morte celular por apoptose e necrose das células K562 pelo ensaio com Anexina V.....	120

Lista de Figuras

Figura 1.- Fórmulas estruturais dos derivados de fenilpropeno.....	7
Figura 2.- Fórmulas estruturais dos álcoois triterpênicos.....	8
Figura 3.- Fórmula estrutural da cetona 20(29) Lupen-3 ona e do 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona.....	9
Figura 4.- Fórmulas estruturais dos flavonóides:Isosativan e Medicarpina.....	10
Figura 5:- Fórmulas estruturais das benzofenonas preniladas.....	11
Figura 6.- Caminhos que levam à morte celular.....	18
Figura 7.- Esquema representativo da apoptose das vias de desencadeamento da apoptose.....	20
Figura 8.- Micrografia eletrônica de morte celular por apoptose e autofagia.....	22
Figura 9 - Micrografia eletrônica de morte celular por necrose e Autofagia.....	25
Figura 10 - Ciclo celular completo.....	27
Figura 11 - Pontos de verificação do ciclo celular	28
Figura 12.- Capacidade inibitória das frações da BRV em células B16F10.....	39
Figura 13 - Determinação da atividade citotóxica da fração BRVA em células de Melanoma murino (B16F10).....	41
Figura 14 - Determinação da atividade citotóxica da fração BRVB em células de Melanoma murino (B16F10).....	42
Figura 15 - Determinação da atividade citotóxica fração BRVC em células de Melanoma murino (B16F10).....	43
Figura 16 - Determinação da atividade citotóxica da fração BRVD em células de Melanoma murino (B16F10).....	44
Figura 17 - Determinação da atividade citotóxica da fração BRVE em células de Melanoma murino B16F10).....	45
Figura 18 - Determinação da atividade citotóxica da fração BRVF em células de Melanoma murino (B16F10).....	46
Figura 19 - Capacidade inibitória da fração BRVD em células B16F10...	49
Figura 20 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas, em células B16F10.....	50
Figura 21 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 48 horas, em células B16F10.....	51
Figura 22 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 72 horas, em células B16F10.....	52
Figura 23 - Capacidade inibitória da fração BRVD em células RPMI 8229.....	54
Figura 24 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas, em células RPMI 8226.....	55
Figura 25 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas, em células RPMI 8226.....	56
Figura 26 – Capacidade inibitória da fração BRVD em células HL60.....	59
Figura 27 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas,	

em células.....	60
Figura 28 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 48 horas, em células HL60.....	61
Figura 29 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 72 horas, em células HL60.....	62
Figura 30 - Capacidade inibitória da fração BRVD em células K562.....	65
Figura 31 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas, em células K562.....	66
Figura 32 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 48 horas,em célulasK562.....	67
Figura 33 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 72 horas, em células K562.....	68
Figura 34 - Capacidade inibitória da fração BRVD em fibroblastos FP...	70
Figura 35 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas, em fibroblastos FP.....	71
Figura 36 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 48 horas,em fibroblastos FP.....	72
Figura 37 - Capacidade inibitória da fração BRVD em fibroblastos MCR-5.....	75
Figura 38 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas,em fibroblastos MCR-5	76
Figura 39 - Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 48 horas,em fibroblastos MCR-5.....	77
Figura 40 - Aspectos morfológicos das células de melanoma murino (B16F10).....	79
Figura 41 - Aspectos morfológicos das células de melanoma murino (B16F10) ampliadas(30µg/ml).....	80
Figura 42 - Aspecto morfológico das células de melanoma murino (B16F10) ampliadas (40 µg/ml)	80
Figura 43 - Aspecto morfológico das células de leucemia prómielocítica (HL60).....	82
Figura 44 - Aspecto morfológico das células de leucemia prómielocítica (HL60) em maior aumento (x20).....	83
Figura 45 - Aspecto morfológico dos Fibroblastos de prepúcio humano (FP).....	84
Figura 46 - Aspecto morfológico dos Fibroblastos de prepúcio humano (FP) em maior aumento.....	85
Figura 47 - Ciclo celular em células B16F10, após 24 horas.....	89
Figura 48 - Ciclo celular em células B16F10, após 48 horas	92
Figura 49 - Ciclo celular em células B16F10, após 72 horas.....	95
Figura 50 - Gráficos da análise do ciclo celular em células B16F10 (G ₂ /M e S).....	96
Figura 51 - Gráficos da análise do ciclo celular em células B16F10 (G ₀ /G ₁ e Morte).....	97
Figura 52 - Ciclo celular em células HL60, após 24 horas.....	100
Figura 53 - Ciclo celular em células HL60, após 48 horas.....	103
Figura 54 - Ciclo celular em células HL60, após 72 horas.....	106
Figura 55 - Gráficos da análise do ciclo celular em células HL60	

(G ₂ /M e S).....	107
Figura 56 - Gráficos da análise do ciclo celular em células HL60 (G ₀ /G ₁ e Morte).....	108
Figura 57 - Ciclo celular em células K562, após 24 horas.....	111
Figura 58 - Ciclo celular em células K562, após 48 horas.....	114
Figura 59 - Gráficos da análise do ciclo celular em células K562 (G ₂ /M e S).....	115
Figura 60 - Gráficos da análise do ciclo celular em células K562 (G ₀ /G ₁ e Morte).....	116
Figura 61 - Gráfico da proporção de células apoptóticas/necróticas HL60, após 24 horas	118
Figura 62 - Histogramas ensaio de avaliação de apoptose pelo método da anexina V em células HL60 após 24 horas.....	119
Figura 63 - Histogramas ensaio de avaliação de apoptose pelo método da anexina V em células K562 após 48 horas.....	121
Figura 64 - Gráfico da proporção de células apoptóticas/necróticas K562 após 48 h.....	122

RESUMO

Estudo do efeito da fração BRVD obtida a partir própolis brasileira tipificada, na proliferação de células tumorais. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.

A própolis, um produto natural derivado de resinas de plantas coletadas por abelhas, foi usada por milhares de anos na medicina tradicional pelo mundo inteiro. Neste estudo, investigamos o efeito de uma fração da própolis vermelha brasileira (BRVD), no crescimento das células de melanoma murino (B16F10), das linhagens hematológicas humanas (HL-60 e K562), e de fibroblastos humanos (MCR-5 e FP). Após a análise preliminar de várias frações da própolis BRV, encontramos que a Fração BRVD inibiu fortemente o crescimento das células de uma maneira dose-tempo dependente pela necrose. Os resultados mostraram que essa fração induz eficazmente um efeito citotóxico em todas as linhagens estudadas, com média da IC50 em torno de 30 µg/mL em 24 h de exposição. Estes resultados sugerem que a atividade antitumor da fração BRVD ocorre com a indução de necrose e os compostos dessa fração podem ser úteis como um agente contra o câncer.

Descritores: Própole, Células tumorais cultivadas, Ensaios de seleção de medicamentos antitumorais, morte celular, necrose.

SUMMARY

Study of fraction BRVD effects gotten by tipificated Brazilian própolis, in the proliferation of tumoraís cells. [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.

Propolis, a natural product derived from plant resins collected by honeybees, has been used for thousands of years in traditional medicine all over the world. In this study we have investigated the effect of some fractions from red Brazilian propolis on the growth of murine melanoma cell (B16/F10), human hematological cells (HL-60 and K562), and human fibroblasts cells (MCR-5 and FP). We found that BRVD strongly inhibited the growth of the cells in a dose- and time-dependent through induction of necrosis. Our results showed that BRVD effectively induced a cytotoxic effect on all cell lines studied, with IC₅₀ average about 30 µg/mL for 24 h of exposition. These results suggest that the antitumor activity of BRVD from red Brazilian propolis occurs through the induction of necrosis and its compounds may be useful as a anticancer agent.

Descriptors: Propolis, Tumor cells cultured, Drug screening assays antitumor, Cell Death, Necrosis.

INTRODUÇÃO

1.1 Própolis

A palavra própolis que vem do Grego - pro (antes de) e polis (cidade), refere-se à observação dos apicultores na antiguidade, que notaram que as abelhas construíam uma pequena parede de própolis na parte dianteira de suas colméias (ou seja, antes da - cidade) (Ghisalberti, 1979).

A própolis é uma substância resinosa altamente aderente produzida em diversos vegetais como árvores, arbustos, flores e troncos, para se protegerem, principalmente no estágio de brotos, pois, são vulneráveis a microrganismos e insetos. A colméia, principalmente as larvas, fica igualmente vulnerável a invasores, levando as abelhas a coletarem essas substâncias que protegem os vegetais, para se protegerem.

A resina dos vegetais é coletada e carregada nas patas traseiras das abelhas coletoras para as colméias, onde, antes de usá-la, é acrescentada de saliva, cera e outras substâncias, (Santos *et al.*, 2003). A presença de açúcares na própolis sugere algum metabolismo por parte das abelhas (Greenaway *et al.*, 1987).

A própolis também é usada para selar os favos durante a chocagem dos ovos, e assim protegem a colônia contra doenças (Burdock, 1998). Foi demonstrado que a própolis mata o mais cruel adversário das abelhas, o *Bacillus larvae* (Mlagan e Sulimanovic, 1982; Meresta e Meresta, 1988).

A própolis vem sendo usada desde tempos bem remotos pela medicina popular (pelo menos desde 300 AC), como tratamento para vários males (Ghisalberti, 1979).

1.2 Composição Química da Própolis

Por causa do seu grande uso na medicina popular, a própolis tem sido o foco de inúmeros estudos farmacológicos e químicos nos últimos trinta anos.

Os primeiros relatos sobre a análise de própolis, baseados em evidências químicas, surgiram na década de 70, quando Lavie, na França (1976) e Popravko, na Rússia (1978) compararam a composição química da própolis européia com a composição química de exsudatos de choupo e bétula. Entre os elementos farmacologicamente ativos mais importantes encontrados na própolis européia, pelo menos 38 tipos: flavonas, flavonois e flavanonas (coletivamente chamados de flavonóides), além de alguns compostos fenólicos e ácidos aromáticos e seus ésteres (Grange e Davey, 1990; Amoros *et al.*, 1992; Marcucci e Bankova, 1999; Marcucci, 2006).

Porém, a composição química da própolis é bastante variável devido à diversidade da vegetação visitada pelos insetos, assim como o odor, a coloração e, conseqüentemente, os seus efeitos (Ghisalberti, 1979). Entre as espécies de plantas usadas pelas abelhas para sua coleta estão plantas como: álamos, bétulas castanha e cinza, vários prunus e salgueiros. Além

disso, notam-se também variações na composição da cera, mostrando que esta igualmente afeta a composição química final da própolis (Crane, 1990).

Em consequência, amostras de própolis de origem tropical têm mostrado significativa diferença na sua composição química, em comparação com as própolis de regiões temperadas, devido a espécies diferentes de plantas encontradas nesses locais e a posição geográfica (Marcucci e Bankova, 1999; Bankova *et al.*, 2000).

Devido a essa enorme variação química da própolis ao redor do mundo, tornou-se claro que, deve-se ter cuidado ao comparar resultados de amostras de própolis de diferentes regiões, como Bulgária e Brasil, porque poderemos estar comparando os extratos de duas plantas que pertencem a famílias diferentes. Assim, para melhor avaliar a atividade biológica entre as própolis encontradas, recentes estudos incluem algum tipo de caracterização química da amostra utilizada (Bankova, 2005).

Recentemente, foi desenvolvido um processo químico de tipificação de várias substâncias químicas presentes na própolis. A tipificação é um processo que emprega marcadores químicos para caracterizar amostras de própolis de regiões distintas (Marcucci, 2006). Dessa maneira, pode-se delinear um perfil químico de diferentes amostras e estabelecer padrões de qualidade (Bankova *et al.*, 2000; Marcucci, 2006).

Também, através do estudo da composição química da própolis, foi possível dividi-la segundo sua origem em grandes regiões geográficas, englobadas em três grupos principais: a) região da Europa, Ásia e América do Norte; b) região da Rússia, e c) região do Brasil.

1.3 Características Gerais da Própolis Brasileira

A própolis brasileira tem origem botânica bastante diversificada, devido à variedade da flora. Mais de 100 compostos individuais foram identificados na própolis brasileira, por esta razão tem despertado o interesse de vários cientistas (Aso *et al.*, 2004; Mishima *et al.*, 2005; Orsolic *et al.*, 2005).

Nas amostras brasileiras poucos flavonóides foram identificados, podendo-se destacar os seguintes: canferide 5, 6,7-triidroxi-3,4'-dihroxiflavona, aromadendrina-4-metil éter (Boudorova-Kravsteva *et al.* 1997), pinobanksina e um derivado do canferol, crisina e galangina (Marcucci *et al.*, 2000).

Por outro lado, foram identificados outros compostos novos, que possuem atividade biológica marcante, como uma classe de compostos fenólicos, os ácidos *p*-cumáricos prenilados, presentes em grande quantidade em amostras brasileiras (Aga *et al.*, 1994; Boudorova - Kravsteva *et al.*, 1997; Bankova *et al.*, 2000), o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), 9-E e 9-Z-2, o composto 2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DCBEN), o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA) e o ácido 2, 2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (DPB) (Marcucci *et al.*, 2001). Alguns destes compostos possuem atividade antimicrobiana e antitumoral (Aga *et al.*, 1994; Banskota *et al.*, 1998).

Trusheva *et al.*, 2006, identificou na própolis da região de Alagoas, altas concentrações de compostos prenilados e benzofenonas.

Recentemente, Marcucci, 2006 observou, através do processo de tipificação, que existem quatro tipos de própolis brasileira, de acordo com suas características químicas: o tipo BRG, BRP (PR), BRP (SP/MG) e um outro tipo misto com marcadores dos grupos BRG e BRP (PR). Também, em recentes estudos, os diferentes tipos de própolis foram citados como BRG, BRPG, BRP-1 e BRV (Ayres *et al.* 2007).

Com isso, abre-se um caminho para a utilização da própolis brasileira tipificada pela indústria farmacêutica.

1.4 Composição Química da Própolis Brasileira Vermelha

A composição química da própolis vermelha brasileira (BRV) foi recentemente caracterizada por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) e 14 compostos foram identificados, sendo que, seis deles ainda não foram identificados em nenhuma própolis (Trusheva *et al.*, 2006). Esses compostos são o *t*-anetol, metileugenol, isoelemicina e elemicina (derivados de fenilpropeno), o composto 20(29)-lupen-3-ona2 (cetona) e composto 3-epóxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (naftoquinona) (Trusheva *et al.*, 2006).

A partir do extrato bruto da própolis vermelha de Alagoas foram isoladas, inicialmente, duas misturas complexas, 4 compostos puros e uma mistura inseparável de dois isômeros (Trusheva *et al.*, 2006).

A primeira mistura complexa que é a fração mais apolar é formada por derivados de fenilpropeno: *t*-anetol; metileugenol; *t*-metiliseugenol;

elemicina; transisoelemicina (Figura 1). Desses compostos, o *t*-anetol, metileugenol, metiliseugenol, isoelemicina e elemicina foram encontrados pela primeira vez em própolis, e nessa fração, a elemicina é o mais abundante. A composição desta fração explica o odor característico, similar a anis da própolis vermelha brasileira.

A segunda mistura complexa foi identificada como álcoois triterpênicos sendo a α -amirina, β -amirina, cicloartenol e lupeol (Figura 2). O mais predominante é a β -amirina. Álcoois triterpênicos são típicos da própolis brasileira (Marcucci e BanKova, 1999).

Um dos compostos puros isolados, também de natureza triterpênica, foi a cetona 20(29)-lupen-3-ona (Figura 3), que foi descrito pela primeira vez na própolis e com comprovada atividade antibiótica contra fungos e bactérias (Kim *et al.*, 2001), atividade antioxidante similar ao tocoferol (Pluim *et al.*, 1980), além da atividade citotóxica (Kim *et al.* 2001).

Outro composto puro isolado foi o 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (Figura 3), substância que até o momento somente havia sido descrito na literatura como um produto sintetizado através da hidrólise por agitação do composto 2-(3-metil-2-butenil)-2,3-epoxi-1,4-naftoquinona 4,4-dimetoxi cetal. Este último composto é biologicamente inativo, (Pluim *et al.*, 1980; Perry *et al.*, 1991).

Figura 1. Fórmulas estruturais dos derivados de fenilpropeno : *t*-anetol; metileugenol; *t*-metilisoeugenol; Elemicina; *t*-isoelemicina (Trusheva *et al.*, 2006).

Figura 2. Fórmulas estruturais dos álcoois triterpênicos: α -amirina, β -amirina, cicloartenol e lupeol (Trusheva *et al.*, 2006).

Foram isolados ainda outros dois compostos puros, isoflavonóides identificados como cristais sem cor, o isosativan e a medicarpina (Figura 4). Estes compostos só foram relatados na própolis cubana (Cuesta-Rubio *et al.*, 2001, Picinelli *et al.*, 2005; Trusheva *et al.*, 2006). A medicarpina já é conhecida por seus efeitos antimicrobianos e especialmente pela atividade antifúngica (Dixon e Paiva, 1995, Trusheva *et al.*, 2006), por induzir apoptose em fibroblastos de pulmão e células mononucleares de sangue periférico (Liu *et al.*, 2002) e efeitos antimitóticos (Militão *et al.*, 2005).

Figura 3. Fórmula estrutural da cetona 20(29)-lupen-3 ona e 2,3-epoxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. O composto 2,3-epóxi-2-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona é um derivado do lapachol (Trusheva *et al.*, 2006).

Na mistura inseparável, foram identificadas duas benzofenonas preniladas que são isômeras: a gutiferona E e o xantoquimol (Figura 5). Esses compostos possuem efeitos citotóxicos contra as células KB (Roux *et al.*, 2000, Tempête *et al.*, 1995), e também demonstraram ter boa atividade contra *S.aureus* e significativa atividade de captura de radicais livres contra o radical difenil picril hidrazila (DPPH) (Trusheva *et al.*, 2006). Foi relatado que

o xantoquimol exibe significativo efeito antiproliferativo e leva a apoptose via ativação de caspase 3 (Matsumoto *et al.*, 2003). Benzofenonas prenildas já foram relatadas como indutoras de apoptose (Balasubramanyam *et al.*, 2004).

Figura 4. Fórmulas estruturais dos flavonóides: Isosativan e Medicarpina. (Trusheva *et al.*, 2006).

Essas benzofenonas prenildas foram consideradas as mais importantes antioxidantes e os componentes mais abundantes no extrato da própolis vermelha (Trusheva *et al.*, 2006).

Foi reportada essa mesma mistura inseparável na resina da *Clusia rósea* e foram detectados traços desses mesmos compostos na própolis cubana originária da resina da *Clusia rosea* (*apud* Trusheva *et al.*, 2006).

Alguns relatos da própolis vermelha na literatura se referem à própolis de Cuba, onde a planta que fornece a resina foi identificada como *Clusia nemorosa* (Ledon *et al.*, 1997; Cuesta-Rubio *et al.*, 2002) e, própolis da Venezuela onde as abelhas coletam da planta *Clusia scrobiculata* (Trusheva

et al., 2004). É possível que a principal planta fornecedora de resina para a própolis vermelha de Alagoas seja alguma espécie de *Clusia* (Trusheva *et al.* 2006).

Figura 5. Fórmulas estruturais das benzofenonas preniladas. A Gutiferona E e o Xantoquimol (Trusheva *et al.*, 2006).

1.4.1 Fração BRVD da própolis vermelha (BRV)

A própolis vermelha foi coletada na região nordeste do Brasil (Alagoas). Seis frações foram obtidas da própolis vermelha a partir do extrato metanólico da própolis (EMP) após fracionamento por cromatografia de filtração molecular, e cedidas gentilmente pelo laboratório de Produtos Naturais, Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci, Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN.

A fração BRVD utilizada neste estudo está sendo analisada quanto a suas características químicas, pela Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas,

cujo responsável é o Dr. Marcos Nogueira Eberlin, UNICAMP. Essa análise está sendo feita através de uma impressão digital (“fingerprint”) pelo método de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), utilizando um espectrômetro de massa Q-TOF (Micromass) híbrido com um quadrupolo e um analisador de massas por tempo de voo (TOF) com alta resolução, na UNICAMP, como descrito no trabalho de Sawaya (Sawaya, *et al.* 2004). Os compostos dessa fração ainda não estão completamente elucidados.

1.5 Atividades Biológicas da Própolis

A própolis tem sido usada na medicina popular em vários países, como sendo um bom remédio tanto na terapia quanto na profilaxia de diferentes processos patológicos (Ghisalberti, 1979). Os extratos etanólicos e aquosos têm sido descritos como tendo um amplo espectro de atividades biológicas.

Lu *et al.* (2005) demonstraram o efeito bactericida, testando extratos etanólicos de amostras de própolis coletadas em diferentes estações do ano e em diferentes regiões de Taiwan em culturas de *Staphylococcus aureus*.

Orsi *et al.* (2005) pré-estimularam macrófagos com própolis brasileiro e búlgaro e foram colocados em contato com *Salmonella typhimurium* em diferentes relações macrófago/bactéria. Concluíram que a própolis aumenta a atividade bactericida do macrófago sendo, a própolis brasileira, mais eficiente do que a búlgara.

Krol *et al.* (1993) testaram o sinergismo do extrato etanólico da própolis com alguns antibióticos. Neste estudo foi verificado que com algumas drogas, o efeito foi moderado, porém um marcado efeito sinérgico com a estreptomicina e a cloxacilina foi observado. Oliveira *et al.* (2006) testaram a própolis contra 67 tipos de fungos isolados de pacientes com oncomicoses, e demonstraram que o extrato de própolis tem excelente desempenho, comprovando a sua atividade antifúngica. Silici *et al.* (2005) comprovaram ação da própolis turca contra micoses superficiais.

Heluihel e Ishano (2001) demonstraram que o extrato aquoso da própolis originária de Israel inibe significativamente a transformação maligna de fibroblastos de rato (NIH/3T3) pelo vírus Moloney do sarcoma murino (Musv-124).

Cunha *et al.* (2004) utilizaram vários extratos de própolis brasileira do estado de São Paulo (BRP), que foram avaliados em relação à sua atividade antitripanosômica (*T.cruzi*), demonstrando que alguns extratos apresentavam uma alta atividade.

Mais recentemente, foi relatado o uso da própolis como um agente contra o protozoário *Giardia duodenalis*, inibindo o seu crescimento e sua aderência (Freitas *et al.*, 2006). Também foi comprovada a ação da própolis na redução da infecção da *Leishmania amazonensis* em macrófagos (Ayres *et al.* 2007).

A atividade citotóxica foi demonstrada por Matsuno *et al.* (1997), usando o ácido 17-hidroxicleoroda-3-dien-15-oico, outro composto isolado da própolis brasileira, no tratamento de linhagens humanas de células de

carcinoma hepático (HuH13), carcinoma de pulmão (HLC-2), células de câncer cervical (Hela), e câncer de cólon (26-L5).

Kimoto *et al.* (2001), utilizando o composto Artepillin C (ácido 3,5 Diprenil-4-hidroxicinâmico), obtido da própolis oriunda das regiões de Minas Gerais (BRP) e Paraná (BRG), demonstraram que as células de melanoma transplantadas em camundongos apresentavam apoptose após 3 semanas de tratamento com 500 mg de Artepillin C via intratumoral. Também foi observada uma inibição no crescimento do tumor com aumento da relação de células T (CD4/CD8) e um número maior no total de células T *helper*.

Akao *et al.* (2003) demonstraram o efeito inibitório da Drupamina e Bacarina e compararam com os efeitos do Artepilin C. Assim, os derivados do ácido cinâmico extraídos da própolis brasileira (BRP), inibiram o crescimento das células da leucemia promielocítica humana (HL60), das células de adenocarcinoma de colon (SW480, DLD-1, COLO201), dos linfócitos periféricos normais estimulados a mitose, em células de câncer gástrico (MKN1, MKN28, MUGC4), em leucemia mielóide crônica (K562) e linfoma histiocítico humano (U937). Entretanto, a atividade anticancerígena de bacarina e drupanina foi levemente menor que a do Artepillin C em linhagens de células de leucemia HL60.

Chen *et al.* (2003) demonstraram que extratos alcoólicos da própolis chinesa tinham atividade antiproliferativa contra várias linhagens de células tumorais, incluindo células de melanoma humano (A2058), células de melanoma murino (B16F10), células de tumor de mama humano (MCF-7), células de hepatoblastoma humano (HepG2), células de carcinoma

hepatocelular humano (Hep3B), e células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29).

Aso *et al.* (2004) demonstraram em células de linfoma histiocítico humano (U937) que o extrato etanólico bruto da própolis brasileira inibe por apoptose, o crescimento destas células e a síntese de macromoléculas de maneira dose-tempo dependente.

Também, foi relatado que as própolis têm ação antioxidante (Chen *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2004), antiinflamatório (Natarajan *et al.*, 1996; Michaluart *et al.*, 1999), imunomodulatório e antimetastásico (Orsolic e Basic, 2003; Orsolic *et al.*, 2004).

A avaliação das atividades biológicas dos compostos da própolis e a elucidação do mecanismo, usado para a realização de suas funções, promovem substancial alicerce para o desenvolvimento de novas drogas.

1.6 Mecanismos da Inibição da Proliferação celular em Tumores Malignos

O tumor maligno é uma neoplasia, onde um determinado grupo de células do corpo se divide de forma descontrolada, invadindo os tecidos adjacentes e/ou distantes. Esse tumor é uma mutação, principalmente de células somáticas, e é uma desordem complexa que envolve distúrbios de vários diferentes caminhos que regulam a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular.

A multiplicação celular é cuidadosamente regulada e responde a necessidades específicas do organismo. Ocasionalmente, o mecanismo que

regula a multiplicação celular é alterado e a célula onde isto ocorre começa a crescer e a se dividir de uma maneira desregulada. Quando uma célula gera células filhas, cuja herança genética tem propensão a proliferar sem responder ao processo regulatório, o resultado é um clone de células com capacidade de se expandir indefinidamente.

Os mecanismos de defesa deveriam ser desencadeados perante situações desfavoráveis e proteger as células do organismo, seja seqüestrando as organelas danificadas, aumentando o catabolismo das proteínas ou promovendo a morte celular, na autofagia, ou ainda induzindo apoptose para eliminar uma célula alterada irreversivelmente, porém, grande parte dos tumores malignos tem alguma deficiência nos mecanismos de apoptose e/ou autofagia, fazendo com que as células proliferem indefinidamente, e tendo, como consequência, a progressão do tumor (Lowe e Lin, 2000).

1.6.1 Morte Celular

A morte celular é um processo reconhecidamente essencial para o normal funcionamento de organismos multicelulares. Imediatamente, após a descoberta da célula, a morte celular começa a ser evidenciada.

Em 1958, Virchow, descreve a necrose. Nos anos 50, com a descoberta dos lisossomos, vem o conceito de célula suicida, e, em 1972, Kerr *et al.*, idealizaram a teoria de morte celular que reconhecia dois tipos de

morte: a necrose como morte forma “violenta” e introduziram o termo “apoptose” como forma programada de morte celular.

Clarke, em 1990, classificou a morte celular programada (PCD do inglês Programmed Cell Death), de acordo com o envolvimento lisossomal, dividindo as mortes em: PCD tipo I – Apoptose. Morte apropriada, programada; PCD tipo II – Autofagia. Sobrevivência celular, morte celular; PCD tipo III – Necrose. Inapropriada, acidental. A necrose foi ainda subdividida em duas categorias Tipo IIIa e Tipo IIIb.

Fink e Cookson, 2005 em uma revisão, descreveram a apoptose, a autofagia e a necrose como caminhos que levam à morte celular. Também, dividiram a necrose em oncoses e piroptose, relatando as distintas características morfológicas de cada uma dessas formas de morte celular (Figura 6).

Apesar de que vários trabalhos terem descrito os tipos de morte celular como entidades independentes, as observações feitas em alguns estudos não sustentam rigorosa distinção entre essas designações em sistemas biológicos, mas, em vez disso, sugerem a natureza da sobreposição dos processos em uma célula que está morrendo. Múltiplos tipos de morte podem ser observados simultaneamente em tecidos ou cultura de células exposta aos mesmos estímulos (Ankarcrona *et al.*, 1995).

A intensidade do estímulo inicial pode influenciar diferentes mecanismos de morte em uma mesma população (Bonfoco *et al.*, 1995; Dypbukt *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 2000; Zysk *et al.*, 2000).

Figura 6. Caminhos que levam à morte celular. Células respondem a estímulos de indução de morte por uma variedade de caminhos que possuem distintas características morfológicas. (Adaptado de: Fink e Cookson, 2005).

1.6.1.1 Morte por Apoptose

Apoptose é um processo altamente regulado na célula, que leva à degradação da mesma. Neste evento, o genoma será partido e a célula irá se desintegrar, formando pequenos corpos que serão posteriormente fagocitados.

A apoptose é marcada pelo encolhimento celular, fragmentação oligonucleosomal do ADN, condensação da cromatina, levando ao aparecimento do núcleo picnótico e desintegração controlada da célula em corpos apoptóticos, através de diferentes vias (Fadok *et al.*, 1992; Walker, *et al.* 1994; Verhoven, *et al.*, 1995; Alnemri *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1996; Castedo *et al.*, 1996; Slee *et al.*, 1999a; Slee *et al.*, 1999b; Brás *et al.*, 2005).

Muitos compostos encontrados na própolis são relatados na literatura como indutores da apoptose, contribuindo assim para a inibição da proliferação em células tumorais. A exemplo do Propolin A, Propolin B e Propolin C, prenilflavonoides isolados da própolis chinesa, que induzem apoptose em células de melanoma (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004), Benzofenonas polisopreniladas, garcinol e curcumina, isoladas da planta *Garcinia* inibem a proliferação das células HL60 por apoptose devido à indução da liberação de citocromo c da mitocôndria e ativação das caspases (Pan *et al.*, 2001).

Figura 7. Esquema representativo das vias de desencadeamento da apoptose. (Adaptado de Vila e Przedborski .2003). Via extrínseca, através da ativação do receptor de morte Fas; via intrínseca, através de sinais intracelulares liberando citocromo c ou ainda, via de ativação de caspase 12.

O Arterpilin C, derivado do ácido cinâmico e constituinte de um tipo de própolis brasileira (tipo BRPG), mostrou um potente efeito citotóxico e induziu altos níveis de apoptose em várias linhagens de leucemia (Kimoto *et al.*, 2001, Kimoto *et al.*, 1998).

Derivados de benzofenonas (como garcinol, isogarcinol e xantoquimol) são relatados com indutores de apoptose em células de leucemia humana (Matsumoto *et al.*, 2003). O garcinol também é relatado como potente inibidor da histona acetiltransferase e indutor de apoptose (Balasubramanyam *et al.*, 2004).

A anoikis (do grego, sem moradia) é a denominação dada a apoptose causada por perda de adesão ou por interação inapropriada (combinação deficiente matriz-integrina) com a matriz extracelular. As células normais de organismos pluricelulares têm a capacidade de desencadear a apoptose nesses casos. Na anoikis todos os achados encontrados na apoptose, incluindo fragmentação nuclear e bolhas nas membranas, também são encontrados (Kerr *et al.*, 1972). O fenômeno de anoikis é considerado uma barreira contra a tumorigênese.

1.6.1.2 Morte por Autofagia

O termo “morte celular autofágica” descreve uma forma de morte celular programada morfolologicamente distinta da apoptose e se presume, resultar de níveis excessivos de autofagia (Schweichel, 1973).

A Autofagia tem um papel importante em todos os tipos celulares. A autofagia acontece em níveis basais nas células em condições normais, mas é rapidamente aumentada quando é preciso gerar nutrientes intracelulares e energia (falta de suprimentos ou na ausência de fatores tróficos); sob remodelamento da arquitetura da célula (durante desenvolvimento); liberação de componentes citoplasmáticos danificados (estresse oxidativo, infecção ou acúmulo de agregados de proteínas). Primariamente, na autofagia aparecem os vacúolos, dilatação da mitocôndria e do retículo endotelial e um ligeiro alargamento do Aparelho de Golgi.

A morte celular, em consequência desse processo foi nomeada de morte celular programada tipo II (Clarke, 1990). Na autofagia, morte celular programada tipo II em contraste com a apoptose, morte celular programada tipo I, há uma precoce degradação das organelas e preservação do citoesqueleto até quase o fim do processo.

Enquanto, a morte por apoptose é caracterizada pela ativação das caspases e pela clivagem internucleosomal do ADN, na autofagia, esses achados, se ocorrerem, acontecem muito mais tarde. Esse processo também necessita de energia.

Diferente da necrose, ambos os processos, apoptose e autofagia, são caracterizados por bloquear a resposta inflamatória.

Atualmente, com o melhor entendimento dos mecanismos da autofagia, as teorias desenvolvidas sobre o assunto sugerem que esse processo contribui para a supressão do tumor e que defeitos na autofagia contribuem para a oncogênese (Kondo *et al.*, 2005).

Entretanto, autofagia ainda não foi observada nos estudos dos efeitos dos compostos derivados de própolis.

Figura 8. Micrografia eletrônica de morte celular por apoptose e autofagia. As setas indicam um corpo apoptótico, à esquerda, e vacúolos autofágicos, à direita (Levine e Yuan, 2005).

1.6.1.3 Morte por Necrose

Necrose é o termo que se usa para se referir a uma morte celular drástica, acidental, manifestação final de uma célula que sofreu lesões irreversíveis. A presença de necrose informa que a célula morreu, mas não como morreu (Figura 9).

A etiologia da necrose envolve todos os fatores relacionados às agressões, podendo ser agrupados em agentes físicos - mecânica, temperatura, radiação, efeitos magnéticos; agentes químicos - compreendem substâncias tóxicas e não-tóxicas, ex.: tetracloreto de carbono, álcool, medicamentos, detergentes, fenóis etc.; e agentes biológicos - infecções viróticas, bacterianas ou micóticas, parasitas etc.

Estes agentes provocam o comprometimento dos níveis celulares de respiração aeróbica, de síntese protéica, de manutenção da integridade das membranas celulares e de manutenção da capacidade de multiplicação celular (ARN e ADN). A ação das causas sobre esses sistemas provoca a perda da homeostase e da morfostase celular, de tal forma que, a célula perde a sua vitalidade. A necrose, assim, abrange alterações regressivas reversíveis que, em algum ponto e por algum estímulo desconhecido, passam a ser irreversíveis. Instalada a irreversibilidade e a necrose propriamente dita, inicia-se o processo de desintegração celular (autólise).

Estudos moleculares têm mostrado que o primeiro evento observado é a alteração na bomba de sódio e potássio, provocando edema intracelular. O metabolismo celular é mantido graças à glicólise. Acabando-se a reserva de glicogênio, ácidos são acumulados no interior da célula (principalmente

ácido láctico), o que leva à diminuição do pH. A acidez provoca a liberação de enzimas lisossomais, o que gera hidrólise de proteínas essenciais para a célula (processo denominado de autólise) (Guidugli-Neto, 1997).

Segundo Clarke (1990), necrose é caracterizada pela ausência de envolvimento lisossomal e pode ser subdividida em duas categorias, tipo IIIa e IIIb. Ambas são marcadas por dilatação das organelas citoplasmáticas, ruptura da membrana plasmática e desintegração do citoplasma, apesar de que o Tipo IIIb envolve uma destruição mais moderada do citoplasma, em conjunção com dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso e a habilidade dessas células morrerem sendo heterofagocitadas.

Segundo Fink e Cookson (2005), a necrose foi subdividida em oncos e piroptose. O termo oncos tem sido aceito por muitos investigadores da morte celular como o oposto da apoptose. Oncose (“onkos” significa inchaço) é definida como um caminho preletal que leva a célula à morte acompanhada de inchaço, bolhas e aumento da permeabilidade da membrana (Majno e Joris, 1995). O processo de oncos primeiramente conduz para a depleção dos estoques de energia celular e falha nas bombas iônicas da membrana plasmática. A oncos pode resultar da ação de agentes tóxicos que interferem com a geração de ATP, ou processos que causam incontrolado consumo de energia (Majno e Joris, 1995).

A piroptose, termo proposto por Fink e colaboradores, onde “pyros”, do grego, significa fogo ou febre e “ptosis”, que significa cair, para descrever uma pro inflamatória de morte celular programada (Cookson e Brennan, 2001).

Essa via é unicamente dependente de Caspase-1 (Hibi *et al.*, 1997; Hibi *et al.*, 1998; Hersh *et al.*, 1999). A caspase-1 não está envolvida no processo de apoptose e uma célula deficiente de caspase-1 responde a maioria dos sinais de apoptose (Li *et al.*, 1995). Uma importante função da Caspase-1 é processar as formas inativas das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-1 δ para suas formas ativas (Fantuzzi e Dinarello, 1999).

A observação da ativação ou dependência da caspase-1 durante a morte celular no sistema imune (Shi *et al.*, 2003), sistema nervoso central (Liu *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003), e sistema cardiovascular (Kologie *et al.*, 2000; Frantz *et al.*, 2003) indica que a piroptose tem um papel significativo em vários sistemas biológicos.

Alguns estudos demonstraram que compostos derivados da própolis podem ter efeitos sobre a necrose em algumas patologias (Orsolic *et al.*, 2003; Orsolic *et al.*, 2004).

Figura 9. Micrografia eletrônica de morte celular por necrose e autofagia. As setas indicam a ruptura da membrana celular, à esquerda, e fragmentação da cromatina, à direita (Levine e Yuan, 2005).

1.6.2 Bloqueio do Ciclo Celular

O ciclo celular é o período durante o qual os eventos necessários para a divisão celular se completam e, basicamente, está dividido em quatro fases. Em uma fase, uma cópia do material genético é produzida, chamada de síntese ou fase S, e em outra, há uma partição de todos os componentes celulares entre as duas células filhas, chamada de mitose ou fase M. As outras duas fases do ciclo representam períodos intermediários, nos quais a célula se prepara para as fases S e M. Esses períodos são chamados de *gaps* (intervalos) 1 e 2 ou fase G_1 e fase G_2 .

Em resposta a sinais intracelulares ou vindos do meio ambiente as células podem escolher vários caminhos: permanecer como estão (quiescentes), diferenciar-se, multiplicar-se ou morrer.

A ocorrência de lesões no ADN requer parada temporária da progressão do ciclo de forma a haver tempo, para o reparo e prevenção de mutações deletérias (McGowan, 2003). Com esse processo, a célula tenta impedir que carcinógenos do meio ambiente, como luz ultravioleta ou radiação ionizante, bem como espécies reativas de oxigênio endógeno, danifiquem o ADN, resultando em desenvolvimento de malformações, acúmulo de mutações que levam a várias doenças, incluindo o câncer.

Figura 10. Ciclo celular completo. A célula eucariótica que recebe o estímulo para a divisão, passa da fase G_1 para as fases S, G_2 e M, ou podem seguir para G_0 e se tornarem quiescentes.

Os pontos de verificação estão no ponto de restrição em G_1 e no fim da fase S, considerados pontos de checagem da fase G_1 ; no limite G_2/M , ponto de checagem da fase G_2 ; e na saída da fase M, ponto de checagem da metáfase (McGowan, 2003). Assim que um problema é detectado o ciclo é bloqueado

A análise molecular de tumores humanos demonstrou que as moléculas reguladoras do ciclo celular estão frequentemente alteradas nas neoplasias. Alterações incluem a superexpressão de ciclinas e dos CDKs, bem como a perda dos seus inibidores.

Passa a ser relevante, a procura de alguma substância que possa ativar, de alguma forma, estes mecanismos de regulação e controle do ciclo celular, a fim de parar o crescimento dos tumores através da indução de

uma célula, que carrega uma bagagem genética totalmente alterada, à morte.

Figura 11. Pontos de verificação do ciclo celular. Caso haja algum tipo de problema nessas fases do processo, a célula normal pára, e repara o erro para seguir adiante no ciclo. Em geral as células tumorais perdem esse controle e se dividem infinitamente e acumulam inúmeras mutações.

2 OBJETIVO

O objetivo é identificar o efeito citotóxico e antiproliferativo da fração BRVD, proveniente da própolis vermelha da região nordeste (Alagoas) do Brasil, através de ensaios *in vitro*.

3 MÉTODOS

3.1 Própolis Vermelha de Alagoas (BRV)

A própolis vermelha foi coletada na região nordeste do Brasil (Alagoas). Seis frações (BRVA, BRVB, BRVC, BRVD, BRVE e BRVF) foram obtidas da própolis vermelha a partir do extrato metanólico da própolis (EMP) e cedidas gentilmente pelo laboratório de Produtos Naturais, Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci, Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN.

3.2 Linhagens de Células

As linhagens de células de melanoma murino (B16F10), mieloma múltiplo humano (RPMI 8226), leucemia mielóide crônica (K562), fibroblastos normais de pulmão humano transformados (MRC-5), e leucemia promielocítica (HL60) foram adquiridas da American Type Culture Collection – ATCC (Rockville, MD). Os fibroblastos de prepúcio humano de cultura primária (FP) foram cedidos pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.3 Cultura de células

As linhagens de melanoma murino (B16F10), mieloma múltiplo humano (RPMI 8226), e leucemia mielóide crônica (K562), foram cultivadas com

meio RPMI 1640 (Life Technologies, NY, USA) com 10 % soro fetal bovino, 10 mM/L tampão HEPES (Merck), pH 7, 2 e 2 mM de L-Glutamina (Sigma - Aldrich - St. Louis USA). A linhagem de fibroblastos normais de pulmão humano (MRC-5) foi cultivada em meio Minimum Essential Medium (Eagle) em solução salina balanceada de Earle (Life Technologies, NY, USA) com 10 % soro fetal bovino (Life Technologies, NY, USA), e a linhagem de leucemia promielocítica (HL60) foi cultivada em Minimum Essential Medium – MEM com suprimentos de aminoácidos não essenciais (Life Technologies, NY, USA) com 20% de soro fetal bovino. Em todos os meios de cultura foram utilizados 100 U/mL de penicilina (Life Technologies, NY, USA), 100 µg/mL de estreptomicina (Life Technologies, NY, USA) e incubados a 37° C, numa atmosfera de 5 % CO₂ e 95 % umidade.

3.4 Avaliação dos efeitos citotóxicos das frações A – F da própolis vermelha de Alagoas (BRV) em células de melanoma murino (B16F10) após 24 horas de tratamento.

Foi utilizada para esse ensaio inicial apenas uma linhagem celular, as células de melanoma murino - B16F10, para triagem das frações.

Essas células (1×10^5 células/mL) foram incubadas durante 24 horas. Após esse período o meio de cultura foi trocado. Para avaliar a citotoxicidade das frações BRVA, BRVB, BRVC, BRVD, BRVE e BRVF, os liofilizados foram dissolvidos em 1 mL de Etanol absoluto p.a. (Merck) filtrados em membrana estéril 0,22µm (Millipore). E, no momento do uso, diluídos em igual volume de água destilada estéril. As frações hidroalcólicas 50% (v/v) (BRVA - BRVF) nas concentrações de 24 , 53, 76 e

106 µg/ml foram adicionadas ao meio de cultura e incubadas durante 24 horas. As células tratadas nas concentrações e período já citados acima foram retiradas das placas de cultura com solução de Tripsina 0,05% (*m/v*) (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), centrifugadas a 1500 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos (Beckman GS-GR centrifuge - US) e o botão celular foi ressuspensão em 1 mL do respectivo meio de cultura. O ensaio de viabilidade celular foi realizado diluindo as células (1:2) em solução de Azul de Tripán (Merck) 0,4 % (*m/v*), e contadas em câmara de Neubauer.

Nos experimentos, a citotoxicidade das frações foram comparadas com um controle de células sem qualquer adição da amostra da própolis, nas mesmas condições do ensaio. Como controle do diluente da amostra, foi utilizado um controle de células e etanol na maior concentração usada. As concentrações finais de etanol utilizadas na preparação hidroalcolica da amostra não excederam 0,1% (*v/v*).

Os resultados são apresentados em nº de células ($\times 10^5$) e representam a média de três experimentos independentes e 1 desvio padrão. Foi calculada a concentração inibitória 50% (IC₅₀) e a capacidade de inibição da proliferação celular(%).

3.5 Estudo da Citotoxicidade da BRVD em linhagens celulares

As linhagens de células B16F10, HL60, K562, MCR-5, FP e RPMI 8226 na concentração de 1×10^5 células/mL foram cultivadas nos respectivos

meios de cultura durante 24 horas. Após esse período o meio de cultura foi trocado.

A Fração BRVD liofilizada foi dissolvida em 1 mL de etanol absoluto , filtrada em membrana 0,22µm (Millipore). E, no momento do uso, esta fração foi diluída em igual volume de água destilada estéril (v/v). A fração hidroalcóolica 50% (v/v), nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL, foi adicionada ao meio de cultura e as células em estudo foram incubadas por 24, 48 e 72 horas de acordo com a curva de crescimento da célula, previamente estabelecida.

Após cada período de incubação as células foram retiradas das placas de cultura com tripsina e centrifugadas a 1500 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos (Beckman GS-GR centrifuge - US). Sobre o botão celular foram então processados os ensaios, de acordo com o teste a ser realizado.

3.6 Avaliação da viabilidade - método de exclusão pelo Azul de Tripan

O botão celular tratado como descrito no item 3.5. foi ressuspenso em 1 mL do respectivo meio de cultura. O ensaio de viabilidade celular foi realizado diluindo as células (1:2) em solução de Azul de Tripan (Merck) 0,4% (m/v), e contadas em câmara de Neubauer. Todos os resultados são apresentados como a média de três experimentos independentes.

3.7 Avaliação por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica usada para contar e analisar as características físicas e moleculares de partículas, como células, que fluem numa suspensão líquida. Através deste método foram realizados os ensaios para avaliar o ciclo celular e apoptose nas células em estudo. Estas células apresentavam uma densidade de 1×10^6 células/mL.

3.7.1 Avaliação das fases do ciclo celular e da fragmentação do ADN (Iodeto de Propídio)

O botão celular tratado das linhagens de células B16F10, HL60 e K562 foi ressuspenso em etanol p.a. (Merck) 70% gelado (1×10^6), lavado 1 vez com solução salina fosfato pH 7,2 (PBS) e incubadas com 200 μ L de Solução de PI (20 μ g/mL de Iodeto de Propídio (Sigma-Aldrich - St. Louis USA) em PBS), durante 30 minutos a temperatura ambiente. A fluorescência emitida a partir do complexo DNA-PI foi quantificada (filtro >600 nm) após excitação (filtro 488nm) pelo citômetro FACScan (Becton Dickinson-Califórnia, EUA).

3.7.2 Avaliação de Apoptose pela Determinação da Fosfatidilserina (Anexina V)

Os botões celulares das células HL60 e K562 foram lavados com PBS e ressuspenso em 100 μ L de tampão Hepes pH 7,4 contendo 20 μ L de solução de Anexina V (Anexina V – 1 g/L adquirida do Laboratório do Dr.

Gustavo Amarante Mendes do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo) e 10 µg/mL de solução Iodeto de Propídio e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. As células foram avaliadas no citômetro FACScan (Becton Dickinson-Califórnia, USA) usando filtro 488 nm para excitação, filtros 515 nm para a detecção da Fluoresceína e 600 nm para o Iodeto de propídio (PI).

3.8 Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) e Capacidade Inibitória da Proliferação Celular

Concentração Inibitória 50% (IC₅₀) foi determinada como a concentração requerida da amostra para inibir o crescimento em 50%. Essa concentração (µg/mL) foi avaliada pela regressão linear e equação da reta. Utilizamos para esse cálculo a viabilidade proporcional (%) pela comparação do grupo tratado com o controle sem tratamento, nos ensaios de exclusão pelo Azul de Tripán. A viabilidade do controle para este cálculo foi assumida ser 100%.

A capacidade inibitória da proliferação celular, representada em porcentagem, foi calculada a partir do número de células do controle e comparada com os experimentos obtidos nos ensaios de exclusão pelo Azul de Tripán. A capacidade inibitória do controle para este cálculo foi assumida ser 0%.

3.9 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como médias e desvios padrões. Os dados foram comparados usando análise de variância one-way (ANOVA) e as diferenças são consideradas significantes se o valor de p for $< 0,05$ de acordo com o teste de comparação de múltipla escolha de Bonferroni. As análises foram feitas usando o programa Graph Pad Prism Versão 3.0 (USA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos efeitos citotóxicos das frações A - F em célula de melanoma murino (B16F10) após 24 horas de tratamento

Os efeitos das concentrações das frações A - F (24, 53, 76 e 106 $\mu\text{g/mL}$), da própolis vermelha brasileira de Alagoas (BRV), aqui identificadas como BRVA, BRVB, BRVC, BRVD, BRVE e BRVF, respectivamente, foram avaliadas através da viabilidade em células de melanoma murino (B16F10), após 24 horas de exposição, usando o ensaio de exclusão por Azul de Tripán (tabela 1). Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes e um desvio padrão.

Tabela 1 – Citotoxicidade das frações da Própolis Vermelha de Alagoas (BRV). Citotoxicidade das frações da BRV em células de melanoma murino (B16F10) após 24 horas de tratamento e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	nº de células ($\times 10^5$)	nº de células ($\times 10^5$)	nº de células ($\times 10^5$)	nº de células ($\times 10^5$)	nº de células ($\times 10^5$)	nº de células ($\times 10^5$)
	Controle	Etanol	24 $\mu\text{g/mL}$	53 $\mu\text{g/mL}$	76 $\mu\text{g/mL}$	106 $\mu\text{g/mL}$
BRVA	$5,3 \pm 0,6$	$6,5 \pm 1,7$	$4,0 \pm 1,5$	$1,6 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$
BRVB	$4,8 \pm 1,1$	$4,0 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,8$	$5,0 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$	0
BRVC	$4,6 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,9$	$3,7 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,1$	0
BRVD	$4,3 \pm 1,2$	$5,0 \pm 0,8$	$1,5 \pm 0,8$	0	0	0
BRVE	$4,5 \pm 0,8$	$3,7 \pm 1,0$	$2,8 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,1$
BRVF	$4,5 \pm 1,3$	$6,5 \pm 0,9$	$5,1 \pm 1,0$	$4,1 \pm 1,1$	$3,9 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,7$

Na tabela 2, estão representados os resultados da capacidade inibitória da proliferação celular de cada fração da BRV e, na Figura 12, a representação gráfica desses valores.

A BRVA apresentou concentração inibitória IC₅₀ de 47,5µg/mL e demonstrou ter efeito citotóxico estatisticamente significativo, a partir da concentração de 53µg/mL ($p < 0,01$). A capacidade inibitória da proliferação celular máxima foi de 92,5% na concentração de 106 µg/mL (Figuras 12 e 13).

A fração BRVB apresentou efeito citotóxico na concentração de 76 µg/mL ($p < 0,001$) e concentração inibitória IC₅₀ de 51,0µg/mL (Figura 14), enquanto que, a fração BRVC demonstrou efeito citotóxico na concentração de 53µg/mL ($p < 0,001$), e IC₅₀ de 46,0µg/mL (Figura 15). A capacidade inibitória da proliferação celular máxima foi de 100% na concentração de 106 µg/mL em ambos os casos (Figura 12).

Como observado na tabela 1, e demonstrado na Figura 16, a BRVD mostrou ser a fração de maior efeito citotóxico, apresentando valores significativos de citotoxicidade na concentração de 24µg/mL ($p < 0,01$). Este fato causou um decréscimo da viabilidade celular dose-dependente, chegando ao máximo de citotoxicidade, com a capacidade inibitória da proliferação celular máxima de 100%, na concentração de 53 µg/mL ($p < 0,001$). A IC₅₀ foi de 25,7µg/mL.

Tabela 2 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da BRV. Capacidade inibitória das frações da própolis BRV em células de melanoma murino (B16F10) após 24 horas de tratamento e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular
	Controle	Etanol	24 µg/mL	53 µg/mL	76 µg/mL	106 µg/mL
BRVA	0,0	0,0	24,5	69,8	83,0	92,5
BRVB	0,0	16,7	18,8	54,2	83,3	100,0
BRVC	0,0	13,0	19,6	63,0	97,8	100,0
BRVD	0,0	0,0	65,1	100,0	100,0	100,0
BRVE	0,0	17,8	37,8	75,6	84,4	95,5
BRVF	0,0	0,0	0,0	8,9	13,3	44,4

Figura 12. Capacidade inibitória das frações da BRV em células B16F10. Gráfico representativo da capacidade de inibitória da proliferação (%) das frações da BRV e do etanol em células de melanoma murino (B16F10) nas concentrações 24, 53, 76 e 106 µg/mL.

A BRVE apresentou IC₅₀ de 42,1µg/mL (Figura 17), e efeito citotóxico estatisticamente significativo na concentração de 53µg/mL ($p < 0,01$). A capacidade inibitória da proliferação celular máxima foi de 95,5% na concentração de 106µg/mL (tabela 1). Enquanto que a fração BRVF apresentou IC₅₀ de 132,2µg/mL (Figura 18), e não teve nenhum efeito citotóxico estatisticamente significativo nessas células ($p > 0,05$). A capacidade inibitória da proliferação celular máxima foi de 44,4% na concentração de 106µg/mL.

Nesse experimento, observamos que o diluente Etanol, testado na maior concentração (106µg/mL), não teve efeito citotóxico ($p > 0,05$). As concentrações utilizadas na preparação hidroalcóolica da amostra nunca excederam 0,1% (v/v) (tabela 1).

Diante desses resultados escolhemos a fração BRVD, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL, nos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação, para avaliação do efeito dose-tempo dependente.

Figura 13. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVA em células de melanoma murino (B16F10). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) IC₅₀ = 47,5 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Efeito citotóxico estatisticamente significativo na concentração de 53 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$).

(A)

(B)

Figura 14. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVB em células de Melanoma murino (B16F10). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) IC₅₀ = 51,0 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Efeito citotóxico foi significativo na concentração de 76 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

(A)

(B)

Figura 15. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVC em células de Melanoma murino (B16F10). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) IC₅₀ = 46,0 µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. Efeito citotóxico foi significativo na concentração de 53µg/mL ($p < 0,001$).

(A)

(B)

Figura 16. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVD em células de Melanoma murino (B16F10), em (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) $\text{IC}_{50} = 25,7 \mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Citotoxicidade significativa em $24 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$) e máximo de citotoxicidade na concentração de $53 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

(A)

(B)

Figura 17. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVE em células de Melanoma murino (B16F10), em (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán, em (B) IC₅₀ = 42,1 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Efeito citotóxico foi estatisticamente significativo na concentração de 53 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$).

Figura 18. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVF em células de Melanoma murino (B16F10), em (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán, em (B) IC₅₀ = 132,2 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. A BRVF não teve nenhum efeito citotóxico estatisticamente significativo nessas células ($p > 0,05$).

4.2 Estudo da Citotoxicidade da BRVD em linhagens celulares tumorais

As linhagens celulares B16F10, HL60, MCR-5, FP, RPMI 8226 e K562 (1×10^5 células/mL) foram tratadas com a BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$. Essas células foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas, dependendo da curva de crescimento, como descrito no item 3.5. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes e 1 desvio padrão.

4.2.1 Células de Melanoma murino – B16F10

As células B16F10 tratadas com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, durante 24 e 48 horas não mostraram efeito citotóxico ($p > 0,05$), porém, na mesma concentração no período de 72 horas mostrou alteração na viabilidade da célula ($p < 0,01$). Entretanto, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ nos períodos de 24 ($p < 0,01$), 48 e 72 horas ocorreu diminuição na viabilidade das células ($p < 0,001$) (tabela 3).

A capacidade inibitória da proliferação celular está representada na tabela 4. Observou-se neste ensaio que na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, a inibição atingiu mais de 65,0% após 24 horas, o mesmo efeito acontece com 10 $\mu\text{g/mL}$ após 72 horas. Após 48 horas na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, a capacidade de inibição é de 88,9%, demonstrando que a fração teve um potente efeito inibitório na proliferação dessas células (Figura 19).

A concentração inibitória IC₅₀ no período de 24 horas foi de 24,9µg/mL (Figura 20). No período de 48 horas, a IC₅₀ foi de 19,2µg/mL (Figura 21) e no período de 72, de 17,2µg/mL (Figura 22), demonstrando que o efeito citotóxico aumenta à medida que aumenta o tempo de exposição e a concentração aplicada.

Tabela 3 – Viabilidade das células de melanoma murino - B16F10 à BRVD. Viabilidade das células de melanoma murino - B16F10 em 24, 48 e 72 horas de incubação com a fração BRVD, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	18,7±3,7	17,0±3,4	6,1±1,8	6,4±1,9	3,4±1,0
48h	30,5±6,0	24,6±6,0	3,4±1,3	2,3±0,4	0,9±0,5
72h	63,8±4,4	19,2±3,5	3,3±0,4	0,2±0,2	0,1±0,1

Tabela 4 – Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da BRVD em B16F10. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular em células de melanoma murino - B16F10.após 24, 48 e 72 horas de incubação com a fração BRVD, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	0	9,1	67,4	65,7	81,8
48h	0	19,3	88,9	92,5	97,0
72h	0	69,9	94,8	99,7	99,8

Figura 19. Capacidade de inibição da proliferação da BRVD em B16F10. Gráfico representativo da capacidade inibitória da proliferação da fração da BRVD em células de melanoma murino (B16F10) nas concentrações 10, 20, 30 e 40µg/mL.

(A)

(B)

Figura 20. Atividade citotóxica da fração BRVD, após 24 horas, em células B16F10. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ em células de Melanoma murino (B16F10) após por 24 horas de tratamento. (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripan. (B) $\text{IC}_{50} = 24,91 \mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. O efeito citotóxico foi observado a partir da concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$).

Figura 21. Atividade citotóxica da fração BRVD ,após 48 horas ,em células B16F10. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ em células de Melanoma murino (B16F10), tratadas por 48 horas. (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripan. (B) IC₅₀ = 19,17 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. O efeito citotóxico foi observado a partir da concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

Figura 22. Atividade citotóxica da fração BRVD ,após 72 horas ,em células B16F10. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40µg/mL, em células de Melanoma murino (B16F10), tratadas por 72 horas. (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán, em (B) IC₅₀ = 17,18 µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. O efeito citotóxico foi observado a partir da concentração de 10 µg/mL ($p < 0,01$).

4.2.2 Células de Mieloma múltiplo – RPMI 8226

As células RPMI 8226 tratadas com a BRVD (tabela 5), no período de 24 horas, apresentaram resultados significativos estatisticamente nas concentrações de 30 µg/mL ($p < 0,05$) e 40 µg/mL ($p < 0,01$), respectivamente. A concentração inibitória IC₅₀ nesse período foi de 32,6µg/mL (Figura 24).

A capacidade inibitória da proliferação celular está representada na tabela 6, onde observa-se que na concentração de 30µg/mL ,a inibição atingiu níveis significativos após 24 e 48 horas (54,2% e 92,3%), respectivamente,mostrando que a fração teve um potente efeito inibitório na proliferação dessas células (Figura 23).

Observou-se significativa perda de viabilidade quando essas células foram incubadas durante 48 horas, a partir da concentração de 30 µg/ml ($p < 0,001$) e IC₅₀ de 23,4µg/mL, mostrando uma resposta progressiva dose-tempo dependente (Figura 25).

Tabela 5 - Viabilidade das células de mieloma múltiplo - RPMI 8226 à BRVD.Viabilidade das células de mieloma múltiplo - RPMI 8226 após 24 e 48 horas de incubação com a Fração BRVD, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	2,4±0,4	2,1±0,5	2,2±0,6	1,1±0,2	0,82±0,2
48h	4,0±0,3	3,8±0,7	3,6±0,6	0,31±0,1	0,16±0,1

Tabela 6 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da fração BRVD em RPMI 8226. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da fração BRVD em células de mieloma múltiplo - RPMI 8226, em 24 e 48 horas de incubação nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular
	Controle	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$
24h	0	12,5	8,3	54,2	65,8
48h	0	5,0	10,0	92,3	96,0

Figura 23. Capacidade inibitória da fração BRVD em células RPMI 8229. Gráfico representativo da capacidade de inibitória da proliferação das frações da BRVD em células de mieloma múltiplo (RPMI 8226) nas concentrações 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 24. Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas,em células RPMI 8226.Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40µg/mL em células de Células de mieloma múltiplo (RPMI 8226) tratadas por 24 horas. (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripan. (B) IC₅₀ = 32,6µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. Ocorreu decréscimo de viabilidade significativa na concentração de 30µg/mL ($p < 0,05$) e 40µg/mL ($p < 0,01$).

Figura 25. Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas,em células RPMI 8226.Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcóolica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40µg/mL, em células de mieloma múltiplo (RPMI 8226), tratadas por 48 horas. (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripan, em (B) IC₅₀ = 23,4µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. O decréscimo da viabilidade foi significativo a partir da concentração de 30 µg/ml da fração BRVD ($p < 0,001$).

4.2.3 Células de Leucemia promielocítica - HL60

Conforme observado na Tabela 7, no período de 24 horas de exposição à BRVD ,foi detectado decréscimo de viabilidade das células HL60 apenas na concentração de 40 µg/mL ($p < 0,05$) (Figura 27). Estes dados foram confirmados com a porcentagem da capacidade de inibir a proliferação (57,1%), nesta mesma concentração (tabela 8). A IC50 neste período foi de 32,0µg/mL. Entretanto, no período de 48 horas foi demonstrada uma diminuição da proliferação celular significativa, a partir da concentração de 10 µg/mL ($p < 0,05$), e uma capacidade inibitória de 67,9% na concentração de 20,0µg/mL (tabela 8). A IC50 neste período foi de 20,0µg/mL (Figura 28).

Também, foi observada uma modificação no comportamento destas células que passaram de suspensão a células aderidas , nas concentrações de 20, 30 e 40 µg/mL depois de incubação de 48 horas (Figura 43).

No período de incubação 72 horas, não foi observada alteração no comportamento das células, mas o decréscimo do número de células foi estatisticamente significativo a partir de 10 µg/mL ($p < 0,01$), mostrando uma IC50 de 15,8µg/mL (Figura 29), e capacidade inibitória da proliferação de 689,5% na concentração de 20,0µg/mL (tabela 8).

Tabela 7 – Viabilidade das células de leucemia promielocítica HL60 à BRVD. Viabilidade das células de leucemia promielocítica HL60, após 24, 48 e 72 horas de incubação com a Fração BRVD, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	nº células (x10 ⁵)	nº células (x10 ⁵)	nº células (x10 ⁵)	nº células (x10 ⁵)	nº células (x10 ⁵)
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	2,8±0,7	2,6±0,6	1,7±0,3	1,4±0,5	1,2±0,5
48h	5,3±0,8	3,5±0,7	1,7±0,3	1,6±0,3	1,2±0,3
72h	8,6±0,6	6,5±0,7	0,9±0,4	0,4±0,2	0,3±0,2

Tabela 8 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular das células HL60 à BRVD. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da fração BRVD em células de leucemia promielocítica HL60 após 24, 48 e 72 horas de incubação com a fração BRVD, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	0	7,1	39,3	50,0	57,1
48h	0	33,9	67,9	69,8	77,4
72h	0	24,4	89,5	95,3	96,5

Figura 26. Capacidade inibitória da fração BRVD em células HL60. Gráfico representativo da capacidade de inibitória da proliferação das frações da BRVD em células de leucemia promielocítica (HL60) nas concentrações 10, 20, 30 e 40µg/mL.

(A)

(B)

Figura 27. Atividade citotóxica, da fração BRVD, após 24 horas, em células HL60.. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, tratadas por 24 horas em células de leucemia promielocítica (HL60). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) IC₅₀ = 32,0 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Detectado decréscimo de viabilidade das células na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$).

Figura 28. Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 48 horas,em células HL60.. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcóolica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40µg/mL, tratadas por 48 horas em células de leucemia promielocítica (HL60). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripan. (B) IC₅₀ = 20,0µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. Diminuição da proliferação celular significativa a partir da concentração de 10 µg/mL ($p < 0,05$).

Figura 29. Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 72 horas,em células HL60.. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, tratadas por 72 horas em células de leucemia promielocítica (HL60), em (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán, em (B) IC₅₀ = 15,8 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Diminuição da proliferação celular significativa a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$).

4.2.4 Células de Leucemia mielóide crônica - K562

As células da leucemia mielóide crônica – K562 demonstraram diminuição de viabilidade estatisticamente significativa ($p < 0,01$) no período de 24 horas de exposição na concentração de 40µg/ml e uma IC50 de 30,3µg/mL (Figura 31).

No período de 48 horas, o número de células viáveis diminuiu e foi estatisticamente significante na concentração de 10 µg/ml ($p < 0,001$). Neste ensaio a IC50 foi de 12,1µg/mL (Figura 32). O mesmo ocorreu nas concentrações 20µg/ml, 30µg/ml e 40µg/ml ($p < 0,001$) da fração da própolis BRVD.

Após 72 horas de exposição obtivemos resultados significativos na análise estatística, a partir da concentração de 10 µg/ml ($p < 0,001$) e a IC50 foi de 6,9µg/mL (Figura 33). Os resultados estão apresentados na tabela 9.

A capacidade inibitória da proliferação celular está representada na tabela 10, onde observou-se que na concentração de 40µg/mL, ocorreu uma de inibição atingiu 81,40% após 24 horas, mas após 48 horas na concentração de 10µg/mL, a capacidade inibitória da proliferação celular foi de 68,5%. Após 72 horas, a capacidade inibitória foi de 89,6% nesta mesma concentração, demonstrando que a fração BRVD tem um potente efeito inibitório na proliferação dessas células (Figura 30).

Tabela 9 – Viabilidade das células de leucemia mielóide crônica - K562 à BRVD. Viabilidade em 24, 48 e 72 horas das células de leucemia mielóide crônica (K562) expostas à Fração BRVD, analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	2,2±0,7	1,8±0,5	1,4±0,3	1,5±0,3	0,5±0,2
48h	5,4±1,2	1,7±0,5	1,2±0,2	0,4±0,1	0,2±0,1
72h	9,6±1,6	1,0±0,2	0,2±0,1	0	0

Tabela 10 - Capacidade Inibitória da Proliferação Celular das células K562 à BRVD. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da fração BRVD em células de leucemia mielóide crônica (K562) após 24, 48 e 72 horas de incubação com a fração BRVD, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	Capacidade Inibitória da Proliferação Celular
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	0	18,1	36,4	31,8	81,4
48h	0	68,5	77,8	92,5	96,3
72h	0	89,6	97,9	100,0	100,0

Figura 30. Capacidade inibitória da fração BRVD em células K562. Gráfico representativo da capacidade de inibitória da proliferação das frações da BRVD em células de leucemia mielóide crônica (K562) nas concentrações 10, 20, 30 e 40 µg/mL.

Figura 31. Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 24 horas,em células K562. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40µg/mL, tratadas por 24 horas em células de leucemia mielóide crônica (K562). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripan. (B) IC₅₀ = 30,3µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. Na concentração de 40µg/ml a diminuição de viabilidade foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

(A)

(B)

Figura 32. Atividade citotóxica da fração BRVD ,após 48 horas,em células K562.Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, tratadas por 48 horas em células de leucemia mielóide crônica (K562). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripan. (B) IC₅₀ = 12,1 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Diminuição da viabilidade celular a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi significativo ($p < 0,001$).

(A)

(B)

Figura 33. Atividade citotóxica ,da fração BRVD ,após 72 horas,em células K562. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40µg/mL, tratadas por 72 horas em células de leucemia mielóide crônica (K562). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) IC₅₀ = 6,9µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. Diminuição da viabilidade celular a partir da concentração de 10µg/ml foi significativo ($p < 0,001$).

4.2.5 Fibroblastos de prepúcio humano – FP

Células normais como os fibroblastos de prepúcio humano – FP, mantidos em cultura, demonstraram diminuição do número de células estatisticamente significativa no período de 24 horas, após exposição com a concentração de 40 µg/ml da BRVD ($p < 0,05$). A concentração inibitória IC50 nesta concentração foi de 31,5µg/mL (tabela 11 e Figura 35). Entretanto, no período de 48 horas houve significância a partir da concentração de 10 µg/ml com $p < 0,001$ e IC50 foi de 21,8µg/mL (Figura 36).

A capacidade inibitória da proliferação celular está representada na tabela 12, onde também observou-se que na concentração de 40µg/mL a inibição atingiu 62,5% após 24 horas, mas após 48 horas, na concentração de 10µg/mL a capacidade inibitória da proliferação celular foi de 42,0% (Figura 34).

Tabela 11 – Viabilidade dos fibroblastos de prepúcio humano – FP à BRVD. Viabilidade em 24 e 48 horas dos fibroblastos de prepúcio humano (FP),

	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	2,4±0,4	1,7±0,4	1,5±0,5	1,4±0,4	0,9±0,3
48h	15,7±1,9	9,1±1,1	6,6±0,6	6,0±1,4	4,2±0,8

analisadas pelo ensaio de exclusão pelo Azul de Tripán depois de expostas à Fração BRVD.

Tabela 12. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular dos fibroblastos FP à BRVD. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da fração BRVD em fibroblastos de prepúcio humano (FP) após 24 e 48 horas de incubação, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ e analisadas pelo ensaio de exclusão pelo Azul de Tripán.

	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular
	Controle	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$
24h	0	29,2	37,5	41,7	62,5
48h	0	42,0	58,0	61,8	73,2

Figura 34. Capacidade inibitória da fração BRVD em fibroblastos FP. Gráfico representativo da capacidade de inibitória da proliferação da fração BRVD em fibroblastos de prepúcio humano (FP) nas concentrações 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 35. Atividade citotóxica da fração BRVD ,após 24 horas,em fibroblastos FP. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, tratadas por 24 horas em células de fibroblastos de prepúcio (FP). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) $\text{IC}_{50} = 31,5\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Houve diminuição significativa de viabilidade na concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$).

Figura 36. Atividade citotóxica da fração BRVD, após 48 horas, em fibroblastos FP. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcolólica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, tratadas por 48 horas em células de fibroblastos de prepúcio (FP). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) IC₅₀ = 21,8 $\mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Existe significância a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

4.2.6 Fibroblastos de pulmão humano MCR-5

Na tabela 13 estão representados os resultados obtidos da linhagem de fibroblastos de pulmão humano – MCR-5. Estes resultados demonstraram uma perda de viabilidade estatisticamente significativa no período de 24 horas de exposição com a BRVD na concentração de 30 µg/mL e 40 µg/mL ($p < 0,05$). e a IC₅₀ de 36,4µg/mL para o mesmo período (Figura 38). No período de 48 horas obtivemos $p < 0,001$ na concentração de 20 µg/ml. Uma IC₅₀ de 20,7µg/mL (Figura 39).

A capacidade inibitória da proliferação celular está representada na tabela 14. Os dados desta tabela mostraram que na concentração de 30µg/mL, a inibição atingiu 54,5% e na de 40µg/mL foi de 50% após 24 horas. Porém, mas após 48 horas, na concentração de 20µg/mL, a capacidade inibitória da proliferação celular atingiu 57,8% chegando ao máximo de inibição em 40µg/mL com 86,7% (Figura 37).

Tabela 13. Viabilidade dos fibroblastos MCR-5 à BRVD. Viabilidade em 24 e 48 horas de fibroblastos de pulmão humano MCR-5 expostas à Fração BRVD, nas concentrações de 10,20,30 e 40 µg/mL analisadas pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)	nº de células (x10 ⁵)
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	2,2±0,4	2,1±0,5	1,8±0,5	1,0±0,3	1,1±0,4
48h	4,5±0,7	3,7±0,4	1,9±0,3	0,9±0,2	0,6±0,2

Tabela 14. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular dos fibroblastos MCR-5 à BRVD. Capacidade Inibitória da Proliferação Celular da fração BRVD em fibroblastos de pulmão humano MCR-5 após 24 e 48 horas de incubação, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio de exclusão pelo Azul de Tripán.

	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular	(%) Capacidade Inibitória da Proliferação Celular
	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
24h	0,0	4,5	18,2	54,5	50,0
48h	0,0	17,8	57,8	80,0	86,7

Figura 37. Capacidade inibitória da fração BRVD em fibroblastos MCR-5. Gráfico representativo da capacidade de inibitória da proliferação da fração BRVD em fibroblastos de pulmão humano (MCR-5) nas concentrações 10, 20, 30 e 40 µg/mL.

Figura 38. Atividade citotóxica da fração BRVD, após 24 horas, em fibroblastos MCR-5. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração hidroalcoólica BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40µg/mL, tratadas por 24 horas em linhagem de fibroblastos de pulmão humano (MCR-5). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) IC₅₀ = 36,4µg/mL avaliada pela regressão linear e equação da reta. Houve decréscimo de viabilidade no período de 24 horas a partir da concentração de 30µg/mL ($p < 0,05$).

(A)

(B)

Figura 39. Atividade citotóxica da fração BRVD, após 48 horas, em fibroblastos MCR-5. Determinação da atividade citotóxica *in vitro* da fração BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, tratadas por 48 horas em linhagem de fibroblastos de pulmão humano (MCR-5). (A) número de células viáveis analisadas pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. (B) $\text{IC}_{50} = 20,7 \mu\text{g/mL}$ avaliada pela regressão linear e equação da reta. Diminuição de viabilidade significativa na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

4.3 Aspectos Morfológicos das células de Melanoma Murino (B16F10), Leucemia Promielocítica (HL60) e Fibroblastos de prepúcio humano (FP)

As células de melanoma murino, leucemia promielocítica e fibroblastos de prepúcio humano , após tratamento com a BRVD apresentaram diminuição no número de células em relação ao controle (Figuras 40, 43 e 45). Foram também observados aspectos morfológicos alterados – (vacuolização) (Figuras 41,42,44 e 46).

Originalmente, a linhagem promielocítica – HL60 desenvolvem-se em suspensão (Figura 43), porém, a medida que as células ficam expostas a crescentes períodos de tempo e concentrações da BRVD, observa-se a adesão destas células.

Por outro lado, as células de melanoma murino após 24 horas de tratamento, na concentração de 20µg/mL apresentaram diminuição no número de células com presença de vacuolização (Figuras 40). Nas concentrações de 30µg/mL e 40µg/mL, a vacuolização é mais intensa, Figuras 41 e 42, respectivamente.

Figura 40. Aspectos morfológicos das células de melanoma murino (B16F10). Células de melanoma murino após 24 horas de tratamento com a BRVD ($\times 10$), em diferentes concentrações. Observar a aparente diminuição do número de células em relação ao controle a medida que a concentração aumenta.

Figura 41. Aspecto morfológico células de melanoma murino - B16F10. As mesmas células de melanoma murino da figura anterior (x10) após 24 horas de tratamento com 30 $\mu\text{g/mL}$ da Fração BRVD, ampliadas. A seta indica a vacuolização citoplasmática.

Figura 42. Aspecto morfológico das mesmas células de melanoma murino - B16F10. As mesmas células de melanoma murino na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ (x10) da figura anterior, porém ampliadas, após 24 horas de tratamento com a BRVD. A seta indica a vacuolização do citoplasma.

As células de leucemia promielocítica – HL60 após 48 horas de exposição com a fração BRVD na concentração de 10 µg/mL, mostraram um crescimento em suspensão , em relação ao controle. Entretanto, nas concentrações de 20, 30 e 40 µg/mL estas células aderiram , esta característica não foi observada no controle. Este fato , deve-se provavelmente ao amadurecimento das células HL60 (Figura 43, (x10)) geradas por essas concentrações da BRVD. Quando observadas em maior aumento (x20) (Figura 44), notamos também a presença de vacúolos.

A vacuolização citoplasmática foi observada em fibroblastos de prepúcio humano, nas concentrações de 30 e 40µg/ml, sem que houvesse uma diminuição da viabilidade celular, mostrado pelo ensaio do Azul de Tripán (Figura 46).

Figura 43. Aspecto morfológico das células de leucemia promielocítica (HL60). Células após 48 horas de tratamento com a BRVD (x10) . Notar a distribuição uniforme das células no controle (A) e na concentração de 10 µg/mL(B), mantendo-se em suspensão, enquanto que nas outras concentrações houve aderência (setas) à placa de cultura (C, D e E).

Figura 44. Aspecto morfológico das células de leucemia promielocítica (HL60) em maior aumento (x20). Em (A) e (B) células HL60 após 48 horas de tratamento com BRVD nas concentrações de 20 e 30µg/mL (x20), respectivamente. Em (C) A concentração de 20 µg/mL (x20) aumentada. As setas indicam a vacuolização citoplasmática.

Figura 45. Aspecto morfológico dos fibroblastos de prepúcio humano (FP). Fibroblastos humanos após 24 horas de tratamento com BRVD nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 µg/mL (x10) .

Figura 46. Aspecto morfológico dos Fibroblastos de prepúcio humano (FP), a mesma foto da figura anterior ampliada. Fibroblastos de prepúcio após 24 horas de tratamento com BRVD nas concentrações de 30µg/ml(A) e 40µg/ml (B), ampliadas . Notar a vacuolização citoplasmática indicada pela seta.

4.4 Avaliação por Citometria de Fluxo

As linhagens de células tumorais e normais foram tratadas com a BRVD de acordo com o ensaio citado no item 3.7, e marcadas com Iodeto de Propídio (PI) para a avaliação do ciclo celular e fragmentação do ADN (item 3.7.1.). Também foi utilizado o ensaio de anexina V para avaliação da apoptose pela determinação da expressão na membrana celular do fosfolípido, fosfatidilserina (item 3.7.2.).

Os resultados apresentados representam a média e um desvio padrão de três experimentos diferentes.

4.4.1 Avaliação das fases do ciclo celular e da fragmentação do ADN

4.4.1.1 Células de Melanoma Murino – B16F10

Os resultados das fases do ciclo celular em células B16F10 estão apresentados nas tabelas de 15 e 16 para o período de exposição de 24 horas, sendo que na tabela 16 pode-se observar os resultados do ciclo celular, sem considerar a população de células que apresentaram fragmentação do ADN (morte).

Os resultados da quantificação da fragmentação do ADN demonstraram que, a partir da concentração de 20µg/mL é significativo estatisticamente ($p < 0,001$), passando de 7,1% para 19,7% (Tabelas 15).

Na tabela 16 podemos observar que na concentração de 10µg/mL não houve variação na proporção de células no ciclo em nenhuma das fases ($p > 0,05$), enquanto que, na concentração de 20µg/mL houve significativo

aumento de células nas fases G_0/G_1 ($p < 0,001$) e de síntese ($p < 0,01$). A fase G_2/M não teve alteração significativa.

Na concentração de $30\mu\text{g/mL}$ ocorreu o inverso, houve aumento de células na fase G_2/M ($p < 0,001$) e houve diminuição da fase de síntese ($p < 0,001$) e da fase G_0/G_1 ($p < 0,001$).

Na concentração de $40\mu\text{g/mL}$ não houve variação estatisticamente significativa em relação ao controle. As células que permaneceram vivas apresentaram o mesmo comportamento na distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular.

Na Figura 47 estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo das células B16F10 após 24 horas de tratamento com a fração BRVD.

Tabela 15 - Ciclo celular de células B16F10 incubadas 24h com a BRVD. Ciclo celular após 24 horas de tratamento com a BRVD em células de melanoma murino (B16F10) analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo (24h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	28,1 ± 4,3	31,6 ± 1,3	27,8 ± 3,4	40,9 ± 6,8	19,5 ± 1,7
S (%)	15,3 ± 1,7	15,6 ± 1,5	5,9 ± 1,9	7,6 ± 2,7	10,0 ± 2,0
G ₀ /G ₁ (%)	49,5 ± 1,7	42,1 ± 3,3	46,6 ± 3,2	31,2 ± 8,2	32,9 ± 2,7
Morte (%)	7,1 ± 3,3	10,7 ± 3,7	19,7 ± 2,5	20,3 ± 1,4	26,4 ± 8,6

Tabela 16 - Porcentagem das células B16F10 no ciclo celular após 24h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo celular após 24 horas de tratamento com a BRVD em células de melanoma murino (B16F10) analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases de ciclo(24h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	30,2 ± 4,3	35,4 ± 1,3	34,6 ± 3,4	51,3 ± 6,8	31,3 ± 1,7
S (%)	16,5 ± 1,7	17,5 ± 1,5	7,4 ± 1,9	9,6 ± 2,7	16,0 ± 2,0
G ₀ /G ₁ (%)	53,3 ± 1,7	47,1 ± 3,3	58,0 ± 3,2	39,1 ± 8,2	52,7 ± 2,7

Figura 47. Ciclo celular em células B16F10, após 24 horas. Histogramas representativos da análise do ciclo celular em células de melanoma murino (B16F10) após 24h de tratamento com a fração BRVD hidroalcolica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada em citometria de fluxo no citômetro FacScan (USA e adquiridos pelo programa Cell Quest).

Nas tabelas 17 e 18 estão representados os resultados das fases do ciclo celular em células B16F10 para o período de exposição de 48 horas. A tabela 18 representa somente o ciclo celular sem considerar a população de células que apresentaram fragmentação do ADN.

O número de células que apresentam fragmentação do ADN passou a ser significativo estatisticamente na concentração de 20µg/mL ($p < 0,001$) (tabela 17).

Observamos que na concentração de 10µg/mL não houve variação no ciclo em nenhuma das fases ($p > 0,05$). Na concentração de 20µg/mL houve significativo aumento de células na fase G₂/M ($p < 0,001$), ao passo que na fase de síntese não houve variação significativa. Na fase G₀/G₁ observamos diminuição significativa ($p < 0,01$).

Na concentração de 30µg/mL, houve aumento de células na fase G₂/M ($p < 0,01$). Entretanto, na fase de síntese, não houve mudanças significativas e, a fase G₀/G₁ houve diminuição do número de células em relação ao controle ($p < 0,05$).

Na concentração de 40µg/mL, houve um aumento do número de células na fase S e diminuição na fase G₀/G₁ ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Porém, na fase G₂/M o aumento do número de células não foi significativo em relação ao controle ($p > 0,05$).

Na Figura 48 estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo da análise das células B16F10, após 48 horas de tratamento com a fração BRVD.

Tabela 17 Ciclo celular de células B16F10 incubadas 48h com a BRVD.
Ciclo celular após 48 horas de tratamento com a BRVD em células de melanoma murino B16F10 analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo (48h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	19,9 ± 2,0	17,7 ± 0,5	30,9 ± 2,2	20,6 ± 2,9	7,8 ± 4,2
S (%)	6,8 ± 1,3	5,1 ± 1,0	4,5 ± 1,6	6,2 ± 2,0	4,4 ± 1,2
G ₀ /G ₁ (%)	64,4 ± 2,5	69,6 ± 0,4	37,5 ± 7,4	36,0 ± 2,2	18,6 ± 6,2
Morte (%)	8,9 ± 0,9	7,7 ± 1,4	27,1 ± 7,0	37,2 ± 4,8	67,0 ± 9,9

Tabela 18. Porcentagem das células B16F10 no ciclo celular após 48h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo após 48 horas de tratamento com a BRVD em células de melanoma murino (B16F10) analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo (48h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	21,8 ± 2,0	19,2 ± 0,5	42,4 ± 2,2	32,8 ± 2,9	25,3 ± 4,2
S (%)	7,5 ± 1,3	5,5 ± 1,0	6,2 ± 1,6	9,9 ± 2,0	14,3 ± 1,2
G ₀ /G ₁ (%)	70,7 ± 2,5	75,3 ± 0,4	51,4 ± 7,4	57,3 ± 2,2	60,4 ± 6,2

Figura 48. Ciclo celular em células B16F10, após 48 horas. Histogramas representativos da análise do ciclo celular em células de melanoma murino (B16F10) após 48h de tratamento com a fração BRVD hidroalcolólica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo no citômetro Facscan (USA) e adquiridos pelo programa Cell Quest.

Os resultados das fases do ciclo celular, para o período de exposição de 72 horas, em células B16F10 estão apresentados nas tabelas de 19 e 20. Na tabela 20 representa o ciclo celular sem considerar a população de células que apresentaram fragmentação do ADN. A fragmentação do ADN passa a ser significativa estatisticamente em 20µg/mL ($p < 0,001$).

Observamos que na concentração de 10µg/mL, não houve variação no ciclo em nenhuma das fases ($p > 0,05$). Na concentração de 20µg/mL, houve diminuição significativa de células na fase G_0/G_1 ($p < 0,001$) e, houve um aumento significativo na fase de síntese ($p < 0,01$) e na fase G_2/M ($p < 0,05$).

Na concentração de 30µg/mL houve aumento da população celular da fase G_2/M em relação ao controle ($p < 0,001$), houve grande aumento de números células na fase S ($p < 0,001$) e diminuição na fase G_0/G_1 ($p < 0,001$). Na concentração de 40µg/mL não foram encontradas células viáveis.

Na Figura 49 estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo das análises das células B16F10 após 72 horas de tratamento com a fração BRVD.

Nas Figuras 50 e 51 estão representados os gráficos das fases G_2/M , S, G_0/G_1 e Fragmentação de ADN nos três períodos de tempo estudados para efeito de comparação.

Tabela 19 - Ciclo celular de células B16F10 incubadas 72h com a BRVD. Ciclo celular após 72 horas de tratamento com a BRVD em células de melanoma murino B16F10 analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do ciclo(72h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	17,8 ± 2,0	14,6 ± 6,0	15,4 ± 6,3	3,2 ± 0,1	0
S (%)	3,1 ± 0,6	2,6 ± 1,4	3,5 ± 0,6	2,2 ± 0,3	0
G ₀ /G ₁ (%)	67,3 ± 3,9	68,6 ± 2,7	27,6 ± 16,6	5,3 ± 1,2	0
Morte (%)	11,7 ± 2,2	14,2 ± 4,7	53,5 ± 22,4	89,3 ± 1,1	100

Tabela 20 - Tabela 18. Porcentagem das células B16F10 no ciclo celular após 72h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo após 72 horas de tratamento com a BRVD em células de melanoma murino (B16F10) analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

72h	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	20,2 ± 2,0	17,0 ± 6,0	33,1 ± 6,3	29,9 ± 0,1	0
S (%)	3,5 ± 0,6	3,0 ± 1,4	7,5 ± 0,6	20,6 ± 0,3	0
G ₀ /G ₁ (%)	76,3 ± 3,9	80,0 ± 2,7	59,4 ± 16,6	49,5 ± 1,2	0

Figura 49. Ciclo celular em células B16F10, após 72 horas. Histogramas representativos da análise do ciclo celular em células de melanoma murino (B16F10) após 72h de tratamento com a fração BRVD hidroalcoólica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo no citômetro Facscan (USA) e adquiridos pelo programa Cell Quest.

Figura 50. Gráficos da análise do ciclo celular em células B16F10(G_2/M e S). Em (A) fase G_2/M e em (B) fase S do ciclo celular em células de melanoma murino (B16F10) após tratamento com a fração BRVD hidroalcolica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo no citômetro FACScan (USA).

Figura 51. Gráficos da análise do ciclo celular (G_0/G_1 e Morte). Em (C) fase G_0/G_1 e em (D) morte ou ADN fragmentado do ciclo celular em células de melanoma murino (B16F10) após tratamento com a fração BRVD hidroalcoólica em diferentes concentrações. Avaliação foi realizada por citometria de fluxo no citômetro Facscan (USA).

4.4.1.2 Células de leucemia promielocítica - HL60

Os resultados das fases do ciclo celular em células HL60 estão representados nas tabelas de 21 e 22 para o período de exposição de 24 horas. Na tabela 22. Os resultados mostram o ciclo celular sem considerar a população de células que apresentou fragmentação do ADN (morte celular).

A tabela 22, mostra que houve aumento no número de células com fragmentação de ADN, significativo estatisticamente, somente na concentração de 40µg/mL ($p < 0,001$).

Observamos na Tabela 21, que no período de 24 horas de exposição não houve resultados estatisticamente significativos nas fases G₂/M. Na fase G₀/G₁ houve um ligeiro aumento significativo no número de células na concentração de 10µg/mL ($p < 0,05$). A fase S, apresentou diminuição no número de células na concentração de 10µg/mL ($p < 0,05$) e, aumento na concentração de 30µg/mL ($p < 0,01$).

Na Figura 52 estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo das análises das células HL60 após 24 horas de tratamento com a fração BRVD.

Tabela 21. Ciclo celular de células HL60 incubadas 24h com a BRVD. Ciclo celular após 24 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia promielocítica (HL60) analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo, nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL.

Fases do Ciclo (24h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	12,8 ± 1,1	10,4 ± 1,6	10,6 ± 1,5	12,8 ± 2,6	9,5 ± 1,0
S (%)	11,3 ± 1,3	8,9 ± 1,0	11,3 ± 1,3	16,4 ± 1,5	7,2 ± 1,3
G ₀ /G ₁ (%)	47,5 ± 2,3	54,6 ± 1,6	51,8 ± 2,4	50,0 ± 2,7	38,6 ± 2,0
Morte (%)	28,4 ± 2,6	26,1 ± 3,0	26,2 ± 4,7	20,9 ± 1,6	44,6 ± 2,6

Tabela 22. Porcentagem das células HL60 no ciclo celular após 24h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo após 24 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia promielocítica (HL60) analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL.

Fases do Ciclo (24h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	17,9 ± 1,1	14,1 ± 1,6	14,4 ± 1,5	16,2 ± 2,6	17,2 ± 1,0
S (%)	15,8 ± 1,3	12,0 ± 1,0	15,3 ± 1,3	20,7 ± 1,5	13,0 ± 1,3
G ₀ /G ₁ (%)	66,3 ± 2,3	73,9 ± 2,6	70,3 ± 2,4	63,1 ± 2,7	69,8 ± 2,0

Figura 52. Ciclo celular em células HL60, após 24 horas. Histogramas representativos da análise do ciclo celular em células de leucemia promielocítica (HL60) após 24h de tratamento com a fração BRVD hidroalcolica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo e adquiridos pelo programa Cell Quest .

Os resultados das fases do ciclo celular em células HL60 estão representados nas tabelas de 23 e 24 para o período de exposição de 48 horas. A tabela 24 representa o ciclo celular sem considerar a população de células que apresentaram fragmentação do ADN (morte).

A fragmentação de ADN foi significativa somente na concentração de 40µg/mL ($p<0,01$), representando 55% do total das células (tabela 23).

Após incubação de 48 horas na concentração de 10µg/mL, a fase G₂/M e a fase S não apresentaram mudanças estatisticamente significativas ($p>0,05$). A fase G₀/G₁ apresentou aumento estatisticamente significativo do número de células ($p<0,05$).

Na concentração de 20µg/mL, a fase G₂/M apresentou diminuição significativa do percentual de células e a fase G₀/G₁ apresentou aumento ($p<0,01$). A fase S não apresentou mudanças ($p>0,05$).

Na concentração de 30µg/mL houve aumento significativo no número de células nas fases G₂/M e S, e uma diminuição na fase G₀/G₁ ($p<0,001$).

Na concentração de 40µg/mL, a fase G₂/M não apresentou mudança estatisticamente significativa ($p<0,05$). A fase S, apresentou aumento, por outro lado a fase G₀/G₁, mostrou uma diminuição do percentual de células estatisticamente significativos ($p<0,001$).

Na Figura 53 estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo das análises das células HL60, após 48 horas de tratamento com a fração BRVD.

Tabela 23 - Ciclo celular das células HL60 incubadas 48h com a BRVD. Ciclo celular após 48 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia promielocítica (HL60) nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo (48h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	10,4 ± 1,0	9,8 ± 1,7	6,7 ± 0,8	16,8 ± 1,3	7,3 ± 0,7
S (%)	4,9 ± 0,3	5,1 ± 0,4	6,0 ± 0,4	13,9 ± 1,1	5,8 ± 0,7
G ₀ /G ₁ (%)	56,2 ± 1,3	72,7 ± 1,2	74,6 ± 1,5	44,4 ± 1,1	28,6 ± 1,7
Morte (%)	28,5 ± 0,7	12,4 ± 1,7	12,7 ± 2,1	24,9 ± 2,3	55,0 ± 3,7

Tabela 24 - Porcentagem das células HL60 no ciclo celular após 48h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo após 48 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia promielocítica (HL60) nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo (48h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	14,5 ± 1,0	11,2 ± 1,7	7,7 ± 0,8	22,4 ± 1,3	17,5 ± 0,7
S (%)	6,9 ± 0,3	5,8 ± 0,4	6,9 ± 0,4	18,5 ± 1,1	13,9 ± 0,7
G ₀ /G ₁ (%)	78,6 ± 1,3	83,0 ± 1,2	85,4 ± 1,5	59,1 ± 1,1	68,6 ± 1,7

Figura 53. Ciclo celular em células HL60, após 48 horas. Histogramas representativos da análise do ciclo celular em células de leucemia promielocítica (HL60) após 48h de tratamento com a fração BRVD hidroalcolica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo e adquiridos pelo programa Cell Quest.

Os resultados das fases do ciclo celular em células HL60 estão representados nas tabelas de 25 e 26 para o período de exposição de 72 horas, sendo que a tabela 26 representa o ciclo celular sem considerar a população de células que apresentaram fragmentação do ADN (morte).

A tabela 26 mostra um aumento na porcentagem de células com fragmentação do ADN estatisticamente significativa nas concentrações de 20,30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$).

No período de 72 horas, houve diminuição do número de células na fase G_2/M na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). Na fase S, nas concentrações de 10 e 40 $\mu\text{g/mL}$, houve um aumento significativo do número de células ($p < 0,01$ e $p < 0,001$). Na fase G_0/G_1 não houve mudanças significativas estatisticamente.

Na Figura 54, estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo das análises das células HL60 após 72 horas de tratamento com a fração BRVD.

Nas Figuras 55 e 56, estão representados os gráficos das fases G_2/M , S, G_0/G_1 e morte nos três períodos de tempo estudados para efeito de comparação.

Tabela 25 - Ciclo celular das células HL60 incubadas 72h com a BRVD. Ciclo celular após 72 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia promielocítica (HL60) nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo(72h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	11,2 ± 1,1	11,1 ± 1,2	6,3 ± 0,6	4,6 ± 0,7	3,2 ± 0,5
S (%)	4,4 ± 0,5	6,9 ± 0,4	3,3 ± 0,7	2,5 ± 0,7	2,6 ± 0,7
G ₀ /G ₁ (%)	64,4 ± 4,2	65,8 ± 1,4	42,5 ± 1,5	30,5 ± 1,4	22,2 ± 2,1
Morte (%)	19,9 ± 4,6	16,2 ± 2,2	47,9 ± 1,4	62,5 ± 1,1	72,0 ± 2,4

Tabela 26 - Porcentagem das células HL60 no ciclo celular após 72h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo após 72 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia promielocítica (HL60) nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo(72h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	14,0 ± 1,1	13,2 ± 1,2	12,1 ± 0,6	12,2 ± 0,7	11,4 ± 0,5
S (%)	5,5 ± 0,4	8,2 ± 0,4	6,3 ± 0,7	6,6 ± 0,7	9,3 ± 0,7
G ₀ /G ₁ (%)	80,5 ± 4,2	78,5 ± 1,4	81,6 ± 1,5	81,1 ± 1,4	79,3 ± 2,1

Figura 54. Ciclo celular em células HL60, após 72 horas. Gráficos da análise do ciclo celular em células de leucemia promielocítica (HL60) após 72h de tratamento com a fração BRVD hidroalcóolica em diferentes concentrações. A avaliação foi feita por citometria de fluxo e adquiridos pelo programa Cell Quest.

Figura 55. Gráficos da análise do ciclo celular HL60 (G₂/M e S). Em (A) fase G₂/M e em (B) fase S do ciclo celular em células de leucemia promielocítica (HL60) após tratamento com a fração BRVD hidroalcolólica em diferentes concentrações. Avaliação foi realizada por citometria de fluxo e adquiridos pelo programa Cell Quest.

Figura 56. Gráficos da análise do ciclo celular (G_0/G_1 e Morte). Em (C) fase G_0/G_1 e em (D) morte ou ADN fragmentado do ciclo celular em células de leucemia promielocítica (HL60) após tratamento com a fração BRVD hidroalcoólica em diferentes concentrações. Avaliação foi realizada por citometria de fluxo e adquiridos pelo programa Cell Quest.

4.4.1.3 Células de leucemia mielóide crônica - K562

Os resultados das fases do ciclo celular em células K562 estão apresentados nas tabelas de 27 e 28 para o período de exposição de 24 horas. A tabela 28 , representa o ciclo celular sem considerar a população de células que apresentaram fragmentação do ADN (morte celular).

Como se observa na tabela 28, não houve mudança significativa no ciclo celular ou na fragmentação do ADN, em nenhuma concentração no período de 24 horas ($p>0,05$).

Na Figura 57, estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo das análises das células K562 após 24 horas de tratamento com a fração BRVD.

Tabela 27 - Ciclo celular das células K562 incubadas por 24h com a BRVD. Ciclo celular após 24 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia mielóide crônica (K562) após tratamento com a BRVD, nas concentrações de 10,20,30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G2/M (%)	18,5 ± 1,6	17,0 ± 1,2	17,2 ± 2,0	21,6 ± 2,6	13,8 ± 2,0
S (%)	12,0 ± 1,1	11,0 ± 1,4	10,7 ± 1,5	14,1 ± 3,2	10,6 ± 1,5
G0/G1 (%)	23,2 ± 1,6	24,0 ± 2,0	27,4 ± 2,9	23,8 ± 2,1	16,6 ± 1,3
Morte (%)	46,3 ± 4,2	48,0 ± 2,2	44,8 ± 2,4	40,4 ± 7,7	59,0 ± 4,7

Tabela 28 – Porcentagem das células K562 no ciclo celular após 24h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo após 24 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia mielóide crônica (K562) após tratamento com a BRVD, nas concentrações de 10, 20,30 e 40 µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G2/M (%)	34,5 ± 1,6	32,7 ± 1,2	31,1 ± 2,0	36,3 ± 2,6	33,7 ± 2,0
S (%)	22,3 ± 1,1	21,2 ± 1,4	19,3 ± 1,5	23,7 ± 3,2	25,9 ± 1,5
G0/G1 (%)	43,2 ± 1,6	46,2 ± 2,0	49,5 ± 2,9	40,0 ± 2,1	40,5 ± 1,3

Figura 57. Ciclo celular em células K562, após 24 horas. Histogramas representativos da análise do ciclo celular em células de leucemia mielóide crônica (K562) após 24h de tratamento com a fração BRVD hidroalcoólica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo e adquiridos pelo programa Cell Quest.

Os resultados das fases do ciclo celular, para células incubadas durante de 24 horas, estão representados nas tabelas 29 e 30. A tabela 30 representa o ciclo celular sem considerar a população de células que apresentaram fragmentação do ADN (morte celular).

A porcentagem de células com fragmentação do ADN aumentou significativamente na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) (Tabela 29).

Como podemos observar na tabela 29, as células de leucemia mielóide crônica - K562 aumentaram o número de células no período G_2/M nas concentrações de 10, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) no período de 48 horas. Enquanto que na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, este aumento de células não foi significativo ($p > 0,05$). A fase S teve um aumento de número de célula significativa nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$) em relação ao controle. Na fase G_0/G_1 , obtivemos diminuição significativa com $p < 0,001$ nas concentrações 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

Na Figura 58, estão representados os histogramas obtidos no citômetro de fluxo das análises das células HL60, após 48 horas de tratamento com a fração BRVD.

Nas Figuras 59 e 60 estão representados os gráficos das fases G_2/M , S, G_0/G_1 e Morte nos três períodos de tempo estudados para efeito de comparação.

Tabela 29 - Ciclo celular das células K562 incubadas por 48h com a BRVD. Ciclo celular após 48 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia mielóide crônica (K562) após tratamento com a BRVD, nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo (48h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	10,3 ± 1,7	18,4 ± 0,6	18,6 ± 0,3	22,4 ± 0,7	3,0 ± 0,2
S (%)	10,1 ± 1,4	13,5 ± 0,6	14,0 ± 0,3	11,3 ± 0,6	4,3 ± 0,3
G ₀ /G ₁ (%)	42,9 ± 1,2	26,5 ± 0,7	28,4 ± 0,4	27,1 ± 0,9	11,4 ± 0,7
Morte (%)	36,7 ± 4,3	41,6 ± 0,4	38,6 ± 0,7	39,9 ± 1,5	81,3 ± 1,1

Tabela 30 - Porcentagem das células K562 no ciclo celular após 48h com a BRVD. Porcentagem das células nas fases do ciclo após 48 horas de tratamento com a BRVD em células de leucemia mielóide crônica (K562) após tratamento com a BRVD, nas concentrações de 10,20,30 e 40µg/mL e analisadas pelo ensaio do Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Fases do Ciclo (48h)	Controle	10µg/mL	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL
G ₂ /M (%)	16,3 ± 1,7	31,5 ± 0,6	30,3 ± 0,3	36,8 ± 0,7	16,0 ± 0,2
S (%)	16,0 ± 1,4	23,1 ± 0,6	22,8 ± 0,3	18,6 ± 0,6	23,0 ± 0,3
G ₀ /G ₁ (%)	67,8 ± 1,2	45,4 ± 0,7	46,8 ± ,4	44,6 ± 0,9	61,0 ± 0,7

Figura 58. Ciclo celular em células K562, após 48 horas. Histogramas representativos da análise do ciclo celular em células de leucemia mielóide crônica (K562) após 48h de tratamento com a fração BRVD hidroalcoólica em diferentes concentrações. A avaliação foi realizada por citometria de fluxo e adquiridos pelo programa Cell Quest

Figura 59. Gráficos da análise do ciclo celular. em células K562 (G_2/M e S). Em (A) fase G_2/M e em (B) fase S do ciclo celular em células de leucemia mieloide crônica (K562) após tratamento com a fração BRVD hidroalcóolica em diferentes concentrações. Avaliação foi realizada por citometria de fluxo e analisadas no programa Cell Quest.

Figura 60. Gráficos da análise do ciclo celular em células K562 (G₀/G₁ e Morte). Em (C) fase G₀/G₁ e em (D) morte ou ADN fragmentado do ciclo celular em células de leucemia mielóide crônica (K562) após tratamento com a fração BRVD hidroalcoólica em diferentes concentrações. Avaliação foi realizada por citometria de fluxo e analisadas pelo programa Cell Quest.

4.4.2 Expressão do fosfolípido (Fosfatidilserina – Anexina V) na membrana celular para a determinação das células apoptóticas

As células das linhagens de leucemia promielocítica (HL60) e mielóide crônica (K562), incubadas nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente, foram preparadas como descrito no item 3.5. A fim de identificarmos qual a natureza da morte. Foram realizados os ensaios de determinação na membrana celular da anexina V por citometria de fluxo em ambas as linhagens,.

Os resultados apresentados representam a média e um desvio padrão de três experimentos diferentes.

4.4.2.1 Expressão do fosfolípido (Fosfatidilserina – Anexina V) na membrana em células HL60

Os resultados do ensaio com Anexina V em células HL60 após 24 horas de tratamento com a Fração BRVD estão apresentados na tabela 31. Os ensaios demonstraram que a morte celular geral foi significativa nas concentrações de 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente.

A morte celular devido a apoptose demonstrou não ser significativa estatisticamente em nenhuma das concentrações estudadas ($p > 0,05$). Entretanto, a necrose foi significativa em todas as concentrações utilizadas apresentando nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente e, nas concentrações de 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,001$.

Na Figura 61 e 62 estão representados os resultados dos ensaios de anexina V da linhagem de células HL60.

Tabela 31 - Morte celular por apoptose e necrose das células HL60 pelo ensaio com Anexina V. Morte celular por apoptose e necrose das células HL60 após 24 horas de tratamento com a BRVD, analisadas pelo ensaio com Anexina V e Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

HL60	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
Apoptose	2,6 ± 0,4	2,2 ± 0,6	2,6 ± 0,7	2,0 ± 0,3	2,6 ± 0,4
Necrose	0,1 ± 0,1	2,2 ± 0,6	2,9 ± 0,8	4,3 ± 0,5	5,7 ± 1,0
Morte Total	2,7 ± 0,5	4,4 ± 1,2	5,5 ± 1,5	6,3 ± 0,8	8,3 ± 1,4

Figura 61. Gráfico da proporção de células apoptóticas/necróticas obtidos de expressão da anexina V em células da linhagem HL60 após 24 h de incubação e tratadas com a fração BRVD.

Figura. 62. Histogramas representativos do ensaio de avaliação de apoptose pelo método anexina V- citometria de fluxo, em células da linhagem HL60 após 24 horas de tratamento com a fração BRVD e analisados no programa WinMid 2.8.

4.2.2.2 Expressão do fosfolipídio (Fosfatidilserina – Anexina V) na membrana em células K562

Os resultados das células K562 após 48 horas de tratamento com a Fração BRVD (Tabela 32) demonstraram que a morte celular foi significativa a partir da concentração de 10µg/mL ($p<0,001$).

A proporção de células em apoptose foi significativa a partir da concentração de 20µg/mL ($p<0,001$), enquanto que, a proporção de células mortas por necrose foi significativa a partir da concentração de 10µg/mL ($p<0,001$). A necrose foi muito mais expressiva do que a apoptose.

Na Figura 63 e 64 estão representados os resultados dos ensaios de anexina V da linhagem de células K562.

Tabela 32 - Morte celular por apoptose e necrose das células K562 pelo ensaio com Anexina V. Morte celular por apoptose e necrose das células K562 após 48 horas de tratamento com a BRVD, analisadas pelo ensaio com Anexina V e Iodeto de propídio por citometria de fluxo.

K562	Controle	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL
Apoptose	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,3	4,3 ± 0,3	6,8 ± 0,5	8,6 ± 0,7
Necrose	29,8 ± 1,1	45,8 ± 2,1	41,5 ± 1,2	66,2 ± 2,8	73,5 ± 2,1
Morte Total	30,8 ± 1,2	47,8 ± 2,4	45,7 ± 1,5	66,2 ± 3,2	82,1 ± ,6

Figura. 63. Histogramas representativos dos experimentos para avaliação das células em apoptose pelo método anexina V-em citometria de fluxo, das células K562 após 48 de tratamento com a fração BRVD e analisados pelo programa WinMid 2.8.

Figura 64. Gráfico da proporção de células apoptóticas/necróticas obtidos da expressão da anexina V em células leucemia mielóide crônica (K562) após 48 horas incubação e tratadas com a fração BRVD.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, testamos diferentes frações da própolis vermelha de Alagoas (BRV) e demonstramos *in vitro* que a BRVD foi mais citotóxica. O efeito de citotoxicidade foi mais pronunciado na fração BRVD >BRVE >BRVC> BRVA >BRVB >BRVF.

Desta maneira, a fração BRVD foi a escolhida para a realização dos ensaios. Os compostos químicos derivados desta fração BRVD estão sendo submetidos ao método de identificação por *fingerprint* em espectrometria de massas e, ainda encontram-se em fase de análise. Assim, o foco deste estudo foi a relação dose-efeito dos compostos existentes na Fração BRVD, analisada em células de linhagens hematológicas (HL60, K562 e RPMI 8226), célula de tumor sólido (B16F10) e em duas linhagens de fibroblastos normais (MCR-5 e FP).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a Fração BRVD provocou efeito citotóxico em todas as linhagens estudadas após 24 horas de exposição, apresentando concentração inibitória 50% (IC50) média aproximada de 30µg/mL e, após 48 horas de 20µg/mL. Esses resultados foram deduzidos a partir da média das IC50 encontradas em cada célula individualmente.

Considerando as IC50 verificamos que as células de melanoma murino (B16F10) são as mais suscetíveis à fração BRVD em 24 horas de exposição, seguidas das células de leucemia mielóide crônica (K562), fibroblastos normais de prepúcio (FP), células de leucemia promielocítica (HL60),

células de mieloma múltiplo (RPMI 8226) e por fim fibroblastos normais de pulmão (MCR-5). Com estes resultados podemos sugerir que os fibroblastos normais de pulmão (MCR-5), mostraram-se os mais resistentes nesse período, enquanto que, entre as linhagens tumorais estudadas, as células de Mieloma Múltiplo (RPMI 8226) mostraram ser mais resistentes aos efeitos citotóxicos da BRVD, após 24 horas de exposição.

No período de 48 horas, considerando as IC50, verificamos que as células de leucemia mielóide crônica (K562), são as mais suscetíveis à fração BRVD. As células de melanoma murino (B16F10), células de leucemia promielocítica (HL60), os fibroblastos normais de pulmão (MCR-5), os fibroblastos normais de prepúcio (FP), e as células de mieloma múltiplo (RPMI 8226), respectivamente, mostraram nessa ordem, serem as células mais resistentes aos efeitos citotóxicos da BRVD, no período de 48 horas.

As células B16F10 demonstraram aumento do efeito citotóxico de maneira dose – tempo dependente. A diminuição da proliferação celular foi devido à morte por necrose, comprovada por citometria e também foi observado vacuolização citoplasmática nesta linhagem de células, a partir da concentração de 20 µg/mL. Nesta concentração foi estatisticamente significativa a perda de viabilidade.

O efeito citotóxico também foi observado na linhagem K562 de leucemia mielóide crônica, entretanto, estas células resistiram mais à exposição durante 24 horas, mostrando perda de viabilidade significativa apenas na concentração de 40 µg/mL.

As células de Leucemia Promielocítica (HL60) , responderam com uma diminuição do número de células em relação ao controle, nas concentrações de 20, 30 e 40 µg/mL após 48 horas, observadas no ensaio de exclusão através do método usando o Azul de Tripán. Porém, no ensaio de citometria de fluxo com iodeto de propídio detectou-se morte celular estatisticamente significativa apenas na concentração de 40 µg/mL. Este resultado sugeriu que a diminuição do número de células, poderia não ser devido à morte celular e sim a inibição da proliferação. Ainda, nesse mesmo período, houve adesão das células nas concentrações de 20, 30 e 40 µg/mL. Este fato causou uma diferença na observação dos resultados entre o método do Azul de Tripán e o método de citometria de fluxo.

A presença dos vacúolos no citoplasma dessas células sugere sofrimento celular em resposta ao efeito tóxico da BRVD.

Na avaliação do ciclo celular, observou-se uma tendência ao aumento do número de células na fase G₀/G₁ nas concentrações de 10 e 20 µg/mL , após 48 horas, resultando em adesão das mesmas durante o seu cultivo. Esse efeito pode ser consequência da maturação dos promielócitos.

Estudos anteriores demonstraram que a HL60 é uma linhagem de leucemia promielocítica, que se diferencia em granulócitos ou monócitos por vários compostos como butilato, dimetil sulfóxido (DMSO), vitamina D3 (Colins *et al.*, 2001; Witt *et al.*, 2001), ácido trans retinóico (ATRA) (Collins, 1987; Castaigne *et al.*, 1990) e também alguns derivados de polifenol e flavonóides (Takahashi *et al.*, 1998; Tamagawa *et al.*, 1998).

A provável indução da linhagem HL60 à diferenciação e a presença de sofrimento das células que evoluíram para a morte celular, pode justificar a aplicação das frações da própolis como um método alternativo no tratamento de tumores.

A vacuolização, também foi presenciada nas células de melanoma murino B16F10 e nos fibroblastos de prepúcio FP. Nesta linhagem celular, os vacúolos foram observados na concentração de 30 µg/mL, no período de 24 horas de incubação, onde não foi constatado nenhum efeito citotóxico.

A presença de vacúolos sugere um possível mecanismo de autofagia, onde a célula na tentativa de eliminar alguma substância agressora, organelas lesadas ou produtos prejudiciais decorrentes de reações químicas, gera vacúolos, chamados autofagossomos, para degradação e eliminação do material não desejado. A morte celular pode acontecer resultante de excessivos níveis de autofagia.

A avaliação do ciclo celular das células de leucemia mielóide crônica (K562) mostrou tendência a aumento de G₂/M e das células de melanoma murino (B16F10) aumento de G₂/M e síntese.

Os estudos para avaliar o tipo de morte celular obtida através dos ensaios da Anexina V em células HL60 incubadas por 24 horas, e em células K562 incubadas por 48 horas, demonstraram que a morte celular obtida foi devida à necrose.

Atualmente, não existem relatos na literatura sobre trabalhos que utilizam a própolis vermelha hidroalcóolica em células tumorais.

A fração BRVD é composta por várias substâncias químicas que podem estar agindo sinergicamente aumentando ou diminuindo um ou outro efeito dependendo do tempo e da concentração da amostra. Compostos isoprenilados extraídos de plantas causam parada no ciclo celular em G_0/G_1 (Wiseman *et al.* 2007). A interação de substâncias encontradas na fração BRVD poderá potencializar, inibindo ou ativando algum efeito importante, que poderá afetar a proliferação das células tumorais..

Assim, este estudo sugere que a Fração BRVD da própolis vermelha de Alagoas poderá atuar como um agente antiproliferativo e anti-tumoral.

6 CONCLUSÕES

- A Própolis vermelha de Alagoas – BRV demonstrou ser citotóxica.
- A fração BRVD foi a mais citotóxica de todas as frações: BRVD > BRVE > BRVC > BRVB > BRVA > BRVE.
- A média das IC50 da BRVD em 24 horas foi 31,3µg/mL.
- A média das IC50 da BRVD em 48 horas foi de 19,5µg/mL.
- As células B16F10 foram mais suscetíveis à fração BRVD em 24 horas, ao passo que os fibroblastos de pulmão (FP), apesar de apresentarem vacuolização citoplasmática, se mostraram os mais resistentes neste mesmo período.
- A presença de vacúolos nas células sugere que as células estariam respondendo de alguma forma à presença de: substâncias tóxicas, organelas em degeneração, ou ainda produtos de catabolismo celular, levando a um evento autofágico, que poderia levar à morte devido à extensa lesão.
- O ciclo celular das linhagens celulares estudadas, com diferentes concentrações e em diferentes períodos de tempo, demonstraram

algumas alterações , sugerindo prováveis efeitos sinérgicos dos compostos existentes na fração BRVD.

- A ação da fração BRVD levou a uma diminuição na proliferação celular em consequência da morte na maioria das células. Este fato, não foi observado nas células HL60 que , provavelmente amadureceram e aderiram , no período de 48 horas nas concentrações de 20 e 30µg/mL. Diminuindo assim, a proliferação , que pode ser observado no aumento de células a fase G_0/G_1 nas concentrações citadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M, Nakajima S. Isolation And Identification Of Antimicrobial Compounds In Brazilian Propolis. *Biosc. Biotechn. Biochem.* 1994. 58:945-6.
- Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* 2004. 52 (24), 7286 -92.
- Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y. Cell Growth Inhibitory Effect of Cinnamic Acid Derivates from Propolis on human Tumor cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 2003. 26(7):1057-9.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996. 87(2):171.
- Amoros M, Sauvager F, Girre L, Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*.1992a. 23:231-40.
- Amoros M, Simões CMO, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes Simplex virus Type1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* 1992b, 55(12):1732-40.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995.15(4):961-73.
- Aso K, Kanno S, Tadani T, Satoh S, Ishikawa M. Inhibitory Effect of propolis on the growth of human Leukemia U937. *Biol.pharm.* 2004. 27(5): 727-30.
- Ayres CD, Marcucci MC, Giorgio S. Effectsof Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*.*Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007.102(2):215-20.
- Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga U, Kundu TK. Curcumin, a novel p300/CREB-binding Protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem.* 2004.279(49):51163-71.
- Bankova V , Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A. Origin of brazilian própolis from São Paulo state. *Z. Naturforsch.* 1999. 54(c):401-5.

Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000.31:3-15.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J.Ethnopharmacol*. 2005.100:114-7.

Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK., Matsushige K., Dsaiki L., Kadota S. Chemical Constituents Of Brazilian Propolis And Their Cytotoxic Activities. *J Nat Prod*.1998.61:896-900.

Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K , Matsushige K., Message D, Huertas AAG, Kadota S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol*. 2000.72:239-46.

Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res*. 2001. 15:561-71.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P , Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with *N*-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. 92:7162– 6.

Boudorova-Kravsteva G, Bankova V, Sforcin JM, Nikolova N, Popov S. Phenolics from Brazilian propolis. *Z Naturforsch*. 1997. 52(C): 676-9.

Bras M, Queenan B, Susin S. A. (Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dung). *Biohimiâ (Biohimiâ)*. 2005.70(2):284-93.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol*. 1998. 36(4):347-63.

Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, Degos L. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood*. 1990.76(9):1704-09.

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A,Kroemer G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Imm*. 1996.157(2):512-21.

Chen CN, Wu CL, Shy HS, Kin JK. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwan sw propolis. *J Nat Prod*. 2003.66:503-6.

Chen CN, Wu CL, Lin JK. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochem. Pharmacol*. 2004.67(1):53-66.

Chen CN, Wu CL, Lin JK. Apoptosis of human melanoma cells induced by novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. *Can. Lett.* 2006.2:1-14.

Chen YJ, Shiao MS, Wang SY. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anti-cancer drugs.* 2001.12:143-9.

Clarke PG, Clarke S. Historic Apoptosis. *Nature.* 1995.378(6554):230.

Clarke PG. Developmental cell death; morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl).* 1990.181(3):195-213.

Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia Cells Induced by Dimethyl Sulfoxide and other Polar Compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978.75:2458-62.

Collins SJ, Ulmer J, Purton LE, Darlington G. Multipotent hematopoietic cell lines derived from C/EBPalpha(-/-) knockout mice display granulocyte macrophage-stimulating factor, granulocyte-colony-stimulation factor, and retinoic acid-induced granulocytic differentiation. *Blood.* 2001.98(8):2382-8.

Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 1987.70(5):1233-44.

Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 2001.9:113-4.

Cooper GM. A célula. Uma abordagem molecular. Tradução de 2ª Edição. Porto Alegre. ArtMed. 2001.

Crane E. *Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources.* Ithaca, NY, USA : Cornstock Publ. 1990.

Cuesta-Rubio O, Fontana-Uribá BA, Pérez JC. Isoflavonoides em propóleos Cubanos. *Rev. Cubana Farm.* 2001.35(Suppl):58-61.

Cuesta-Rubio O, Fontana-Uribá BA, Ramirez-Apan T, Cardenas J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis: biological activity of nemorosone. *Z Naturforsch.* 2002. 57(c):372-8.

Cunha IBS, Sawaya ACFH, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, Povia GS, Carvalho PO. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* 2004. 15(6):964-70.

Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 1995.7:1085-97.

Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shas SA, Naqui SAH, Dandyia PC. Antiinflammatory, antibacterial, antifungal, antiamebic, and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.* 1991. 35: 77-82.

Doležel, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *J Appl Gen* . 1997.38 (3):285-302.

Dypbukt JM, Ankarcrona M, Burkitt M, Sjöholm A, Strom K, Orrenius S Nicotera P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:30553–60.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992.148(7): 2207-16.

Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 β : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J. Clin. Immunol.* 1999. 19:1–11.

Farber E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol.* 1994.7:605-9.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immunol.* 2005. 73(4):1907-16.

Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, Moreira JF, Keshavjee S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000.162:1932–9.

Flers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999. 18:7719-30.

Frantz, S, Ducharme A, Sawyer D, Rohde LE, Kobzik L, Fukazawa R, Tracey D, Allen H, Lee RT, Kelly RA. Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2003.35:685–94.

Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimaraes S. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine.* 2006.13(3):170-5.

Ghisalberti, E. L. Propolis: a Review. *Bee World.* 1979. 60:58-84.

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J.R Soc Med.* 1990.83:159-160.

Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The Analysis of Bud Exudate of *Populus x euramericana*, and of Propolis, by Gas Chromatography--Mass Spectrometry. *Proc. R. Soc. Lond B*. 1987.232(1268):249-72.

Guidugli-Neto, J. Elementos de Patologia Geral. São Paulo : Santos, 1997.

Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S Zychlinsky A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .1999. 96:2396–401.

Hilbi H, Chen Y, Thirumalai K ,Zychlinsky A. The interleukin 1_β-converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.*1997.65:5165–70.

Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, Flavell RA, Yuan J, Sansonetti PJ, Zychlinsky A. Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J. Biol. Chem.* 1998.273:32895–900.

Huleihel M, Ishano V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus. *Arch Virol.* 2001.146:1517-26.

Kanzawa T, KondoY, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of Autophagic Cell Death in Malignant Glioma Cells by Arsenic Trioxide. *Cancer Research.* 2003.63: 2103-8.

Kerr JFR ,Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972.26(4): 239-57.

Kim EM , Jung HR, Min TJ. Purification, structure determination and biological activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull.exFr) Bond et Sing. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2001. 22:59-62.

Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M, Mito K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extrated from Brazilian propolis. *Cancer Detect. Prev.* 1998.22(6):506-15.

Kimoto T, Aga M, Hino K, Koya-Miyata S, Yamamoto Y, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res.* 2001. 21(1A): 221-8.

Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Virmani R. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am. J. Pathol.* 2000.157:1259–68.

Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat.Rev.Cancer*. 2005.5:726-34.

Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneim. Forsch. Drug Res*. 1993. 43:607-8.

Kumazawa SH, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama TS. Direct Evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull*. 2003. 51(6):710-42.

Lavie P. The relationship between propolis, poplar buds (*Populus spp*) and castoreum. Proc. XXV International Beekeeping Congress. Grenoble. 1975. *Apimondia. Publication House*. Bucharest. 1976.229-33.

Ledon N, Casaco A, Gonzalez R, Merino N, Gonzalez A, Tolon Z. Antipsoriatic, anti-inflammation, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1997.18(3):274-6.

Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest*. 2005.115 (10):2679-88.

Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, Towne E, Tracey D, Wardwell S, Wei FY, Wong W, Kamen R, Seshadri T. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 1995.80:401-11.

Liu ZL, Tanaka S, Horigome H, Hirano T, Kitaro O. Induction of Apoptosis in Human Lung Fibroblasts and Peripheral Lymphocytes *in vitro* by Shosaiko-to derived phenolic metabolites. *Biol. Pharm. Bull*. 2002.2591:37-41.

Liu XH, Kwon D, Schielke DP, Yang GY, Silverstein FS, Barks JD. Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1999.19:1099-108.

Lizard G, Gueldry S, Sordet O, Monier S, Athias A, Miguët X, Bessède G, Lemaire S, Solary E, Gamber P. Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J*. 1998.12:1651-63.

Lowe SW, Lin AW. Apoptosis and cancer. *Carcinogenesis*. 2000.21(3):485-95.

Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2005.102(2):213-20.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995.146(1):3-15.

Marcucci MC, Bankova V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian própolis. *Curr. Top. Phytochem.* 1999.2:115-23.

Marcucci MC, Ferreres F, Custódio AR, Ferreira MMC, Bankova VS, Garcia-Viguera C, Bretz WA. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Zeitschrift für Naturforschung.* 2000. 55(C):76-81.

Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PHM, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological Activities. *J. Ethnopharmacol.* 2001.74:105-12.

Marcucci MC. Própolis Tipificada: Um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. *Rev Fitos.* 2006. 1(3): 36-46.

Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee PW, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* 2004.430:213-8.

Martin A, Wiggs CL, Leslie G, Ungerleider LG, James V. Neural correlates of category-specific knowledge. *Nature.* 1996.379:649-52.

Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ito T, Ohguchi K, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. Cytotoxic benzophenone derivatives from *Garcinia* species display a strong apoptosis-inducing effect against human leukemia cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 2003.26(4):569-71.

Matsuno T, Jung S K, Matsumoto Y, Morikawa J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *J. Anticancer Res.* 1997.17:3565-68.

McGowan CH. Regulation cell cycle. In: Meijer L, Jezequel A, Roberge M, eds. Progress in Cell Cycle Research. 2003.p.1-4.

Meresta, T. and Meresta, L. [Sensitivity of *Bacillus larvae* to an extract of propolis in vitro.] *Medycyna Weterynaryjna.* 1988.44(3):169-70.

Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ. Inhibitory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on the Activity and Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Oral Epithelial Cells and in a Rat Model of Inflammation. *Cancer Research.* 1999.59:2347-52.

Militão GCG, Jimenez PC, Wilke DV, Pessoa C, Falcão MJC, Lima MAS, Silveira ER, Moraes MO, Costa-Lotufo LV. Antimitotic Properties of Pterocarpanes Isolated from *Platymiscium floribundum* on Sea Urchin Eggs. *Planta Med.* 2005. 71:686-5.

Mishima S, Yoshida C, Akino S, Sakamoto T. Antihypertensive effects of Brazilian propolis: identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(10):1909-14.

Mlagan V, Sulimanovic D. Action of propolis solutions on *Bacillus larvae*. *Apiacta.* 1982;17:16-20.

Moreno MIN, Zampini IC, Ordóñez RM, Jaime GS, Vattuone MA, Isla MI. Evaluation of the Cytotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, and Antimutagenicity of Propolis from Tucuman, Argentina. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53(23):8957-62.

Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-Kappa B. *Proc Natl Acad Sci.* 1996. 93:9090-95.

Oliveira AC, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TI. Antifungal activity of propolis extract yeasts against isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(6):493-7.

Ogier-Denis E, Pattingre S, El Benna J, Codogno P. Erk1/2-dependent phosphorylation of Gα-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J.Biol.Chem.* 2000;275(50):39090-95.

Orsi RO, Sforcin JM, Funari SR, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *Int Immunopharmacol.* 2005. 5(2):359-68

Orsolic N, Basic I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethnopharmacol.* 2003. 84(2):265-73.

Orsoli N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J.Ethnopharmacol.* 2004;94:307-15.

Orsolic N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(10):1928-33.

Paglin S, Lee NY, Nakar C, Fitzgerald M, Plotkin J, Deuel B, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Lampen N, Yahalom J. Rapamycin-Sensitive

Pathway Regulates Mitochondrial Membrane Potential, Autophagy, and Survival in Irradiated MCF-7 Cells. *Cancer Research*. 2005.65:11061-70.

Pan J, Xu G, Yeung SC. Cytochrome c release is upstream to activation of caspase-9, caspase-8, and caspase-3 in the enhanced apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells induced by manumycin and paclitaxel. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001.86(10):4731-40.

Park KY, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of brazilin propolis. *J. Agric. Food Chem*. 2002.50:2502-6.

Perry NB, Blunt JW, Munro MHG. A cytotoxic and antifungal 1,4-naphthoquinone and related compounds from a New Zealand brown alga *Landsburgia quercifolia*. *J. Nat. Prod*. 1991. 54:978-85.

Picinelli AL, Fernandez MC, Costa-Rubio O, Hernandez IM, De Simone F, Rastrelli L. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *J. Agric. Food Chem*. 2005.53:9010-6.

Pluim H, Wynberg H. Catalytic asymmetric induction in oxidation reactions. Synthesis of optically active epoxynaphthoquinones. *J Org Chem*. 1980.45:2498.

Popravko, SA. Chemical composition of propolis, its origin and standardization em: A Remarkable Hive Product: Propolis. *Apimondia Publication House*. 1978. Bucharest p.15-8.

Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis.: *Science*. 2001.293(5536):1829-32.

Roux D, Hadi HA, Thoret S, Guenard D, Thoison O, Pais M, Sevenet T. Structure-Activity Relationship of Polyisoprenyl Benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the Tubulin/Microtubule System. *J. Nat. Prod*. 2000. 63 (8):1070 -76.

Santos FA, Bastos EM, Maia AB, Uzeda M, Carvalho MA, Farias LM, Moreira ES. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytother Res*. 2003.17(3):285-9.

Sawaya ACHF, Tomazela DM, Cunha IBS, Bankova VS, Marcucci Mc, Custodio AR, Eberlin MN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst* .2004.129 : 739 – 44.

Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 1973. 7:253–66.

Shi L., Chen G, MacDonald G, Bergeron L, Li H, Miura M, Rotello RJ, Miller DK, Li P, Seshadri T, Yuan J, Greenberg AH. Activation of an interleukin 1 converting enzyme-dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. 93:11002–7.

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *eCAM*. 2005. 2:33-8.

Silici S, Koç NA, Ayangil D, Çankaya S. Antifungal Activities of Propolis Collected by Different Races of Honeybees Against Yeasts Isolated From Patients With Superficial Mycoses. *J Pharmacol Sci*. 2005.99(1):39-44.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death & differentiation*.1999a. 6(11):1067-74.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. *J. Cell Biol*.1999b.144(2):281-92.

Song YS, Jin C, Jung K, Park EH. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *J. Ethnopharmacol*. 2002. 82:89-95.

Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998. 62(11):2199-204.

Tamagawa K, Fukushima S, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Proanthocyanidins from barley bran potentiate retinoic acid-induced granulocytic and sodium butyrate-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998. 62(8):1483-7.

Tempête C, Werner GH, Frave F, Roja A, Langlois N. In vitro cytotoxic activity of demethoxypropylthramycin B. *Eur.J.Med. Chem*. 1995. 30:647-50.

Trump BF, Berezesky IK, Chang SK, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol*.1997.25:82–8.

Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvetkova I, Rodriguez JG, Bankova V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*. 2004. 75:683-9.

Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995. 182:1597-61.

Trusheva B , Popova M, Bankova V, Simona S, Marcucci MC, Miorin PL,Pasin FR,Tsvetkova I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *eCAM*. 2006. 3(2):249-54.

Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of Phosphatidylserine Exposure, A Phagocyte Recognition Signal, on Apoptotic T Lymphocytes. *J Exp Med*. 1995 182(5):1597-601.

Vila M, Przedborski S.Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003. 4(5): 365-75.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: A (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. 1994.78:343–52.

Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007.320(3):1163-70.

Witt O, Schulze S, Kanbach K, Roth C, Pekrun A. Tumor cell differentiation by butyrate and environmental stress. *Cancer Lett*. 2001. 171(2):173-82.

Yanagisawa H, Miyashita T, Nakano Y.,Yamamoto D. Hspin, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-x_L, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death and Diff*. 2003.10: 798-807.

Yang Y, Liang Z, Gu Z, Qin Z. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005. 26(12):1421-34.

Zhang WH, Wang X, Narayanan M, Zhang Y, Huo C, Reed JC, Friedlander RM. Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 2003. 100:16012–17.

Zysk G, Bejo L, Schneider-Wald BK, Nau R, Heinz H. Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Exp. Immunol*. 2000. 122:61–6.