



**UFVJM / FCBS / PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

Ricardo Lopes Rocha

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM MUCOSA BUCAL: MODELO DE
CARCINOGENESE INDUZIDA POR DMBA**

**Diamantina
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

RICARDO LOPES ROCHA

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM MUCOSA BUCAL EM MODELO DE
CARCINOGENESE INDUZIDA POR DMBA**

Diamantina

2012

RICARDO LOPES ROCHA

**EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM MUCOSA BUCAL EM MODELO DE
CARCINOGENESE INDUZIDA POR DMBA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Odontologia para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Flaviana Dornela Verli
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Nádia Lages Lima

Diamantina

2012

Ficha Técnica

Mestrando Ricardo Lopes Rocha: experimento, fotografias, análise estatística, redação
Dr^a. Flaviana Dornela Verli: concepção original, experimento, fotografias, orientação
Dr^a. Nádia Lages Lima: concepção original, análise histopatológica, orientação
Dr^a. Fernanda Ferreira Oliveira: análise estatística
Dr. Alexandre Soares dos Santos: análise química dos extratos de própolis
Ac. Poliana Ribeiro Barroso, graduanda do curso de Farmácia: experimento, redação
Sr. Leonardo Monteiro Cunha e Sr. Luiz Eduardo Tibães, técnicos: cortes histológicos e coloração
A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FCBS) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

Ficha Catalográfica

L864e 2012	Lopes-Rocha, Ricardo Efeito do extrato de própolis em mucosa bucal: modelo de carcinogênese induzida por DMBA. / Ricardo Lopes Rocha. - Diamantina: UFVJM, 2012. 71 p.: il. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri / Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde / Departamento de Odontologia. Orientadora: Prof ^a . Dr ^a . Flaviana Dornela Verli Coorientadora: Prof ^a . Dr ^a Nádia Lages Lima 1. Carcinogênese. 2. DMBA. 3. Mucosa bucal. 4. Língua. 5. Própolis. I. Verli, Flaviana Dornela. II. Título. CDD: D65
-----------------------	---

Bibliotecária Responsável
Ieda Maria Silva
CRB-6ª nº 1251

RICARDO LOPES ROCHA

EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM MUCOSA BUCAL: MODELO DE
CARCINOGENESE INDUZIDA POR DMBA

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Odontologia para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA EM 10/02/2012

Prof^a. Dr^a. Flaviana Dornela Verli – DCB / UFVJM
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Maria Cássia Ferreira de Aguiar – UFMG

Prof^a. Dr^a. Patrícia Furtado Gonçalves – DO / UFVJM

Diamantina

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Mariana, Luiz Ricardo e Danilo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, sem ter a pretensão de definir o porquê;

Ao meu pai, **Arnaldo Pinheiro Paulino Rocha**, in memorian, e à minha mãe, **Corália Lopes Rocha**, pelos ensinamentos, amor incondicional. Desde a infância, aprendi o valor da liberdade, da vida em família, a diversidade dos caminhos e como segui-los. Agradeço-lhes pelo exemplo, dons, educação e por me ensinarem a arte da escolha. Valores que são irrestituíveis; por isso, compartilho-os com os meus filhos;

Aos meus filhos, **Mariana, Luiz Ricardo e Danilo**, pela convivência, mesclada de doação e aprendizagem de ambos os lados. Por vocês, estou em constante mudança;

À minha esposa, **Magaly**, por cada dia compartilhado. São tantos os motivos, assim deixo registrado o amor e a compreensão, fontes de nossa convivência;

À tia **Helena**, por ser um exemplo de disciplina, trabalho e perseverança que são valores e estímulos para a minha vida. E pelo cuidado com a minha educação;

Ao Prof. **José Cristiano Ramos Glória**, por ter sido um dos responsáveis pela mudança na trajetória da minha carreira profissional;

Aos **graduandos do curso de Odontologia**, que, pacientemente, me fizeram entender a sutil arte de perceber e de apreciar as diferenças;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Flaviana Dornela Verli**, pela disponibilidade, prontidão, zelo e dedicação ímpar que colaboraram para o alcance desta etapa;

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. **Nádia Lages Lima**, pela amizade de longa data e pela paciência transmitida durante as orientações;

À Prof^a. Dr^a. **Maria Cássia Ferreira de Aguiar**, pela colaboração e disponibilidade para conosco;

À graduanda do curso de Farmácia, **Poliana Ribeiro Barroso**, pela ajuda, desprendimento, e colaboração durante o experimento;

Aos **funcionários e amigos da UFVJM**, pelo profissionalismo e dedicação. Especialmente, aos técnicos do Laboratório de Patologia da UFVJM, **Leonardo Monteiro Cunha** e **Luiz Eduardo Tibães**, pela confecção das lâminas histológicas;

Aos **colegas do departamento de Odontologia** por terem colaborado durante a realização desta capacitação, fruto de uma amadurecida escolha. Em especial, agradeço aos professores **Mauro Antônio da Cruz Batista** pela cooperação e **Patrícia Furtado Gonçalves** pela disponibilidade;

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFVJM**, em especial, à Coordenadora do PPGOdonto, Prof^ª. Dr^ª. **Maria Letícia Ramos Jorge**, pela ousadia de enfrentar este desafio;

Aos meus colegas de mestrado, **Carlos Eduardo Pinto de Alcântara**, **Dimitri Ribas Fonseca**, **George Moreira Costa**, **Saulo Gabriel Moreira Falci**, **Patrícia Corrêa de Faria**, **Paulo Antônio Martins Júnior** e **Raquel Gonçalves Vieira Andrade**, pela cumplicidade, companheirismo e momentos que passamos juntos;

Ao **destino**, no qual terei que acreditar em algum momento, que, coincidentemente, dosa cada fato, circunstância e sentimento na hora, lugar e momentos exatos de minha vida;

Por ter nascido em **Diamantina**, recanto deste país maravilhoso, **Brasil**. O fato de me encontrar nesta terra de pessoas acolhedoras, recondiciona as minhas energias para que eu possa vencer as adversidades;

Sempre haverá outras pessoas que fizeram parte desta trajetória, e, mesmo que não estejam mencionadas, a minha gratidão fica registrada. Muito obrigado!

“Não acredite em algo simplesmente porque ouviu. Não acredite em algo simplesmente porque todos falam a respeito. Não acredite em algo simplesmente porque está escrito em seus livros religiosos. Não acredite em algo só porque seus professores e mestres dizem que é verdade. Não acredite em tradições só porque foram passadas de geração em geração. Mas depois de muita análise e observação, se você vê que algo concorda com a razão, e que conduz ao bem e benefício de todos, aceite-o e viva-o.”

Siddhartha Gautama

RESUMO

A presente dissertação consiste em dois artigos científicos, sendo um artigo original e outro de revisão. Em um dos artigos, os autores fizeram uma revisão da literatura sobre câncer e própolis, abordando a carcinogênese experimental induzida quimicamente pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), a composição química da própolis e seus efeitos quimiopreventivos. O objetivo do artigo de pesquisa foi avaliar a reação tecidual da mucosa lingual de *hamsters*, submetida à aplicação diária e alternada de DMBA e extrato etanólico de própolis (EEP) de uma apresentação comercial. Materiais e métodos: 60 *hamsters* foram divididos em três grupos, com dois períodos experimentais, 13 e 20 semanas. A borda lateral da língua foi submetida à aplicação tópica, diária e alternada de DMBA 0,5 % e EEP 30 % (grupo EEP, n = 20), DMBA 0,5 % e extrato aquoso de própolis (EAP) (grupo EAP, n = 20), DMBA 0,5 % e soro fisiológico (grupo DMBA, n = 20). Realizou-se análise da ocorrência dos tipos de alterações clínicas e histológicas. Mensurou-se a área e volume das alterações clínicas, a ocorrência das alterações estruturais (AE) e citológicas (AC) do tecido epitelial escamoso com atipias e a área histológica dos carcinomas de células escamosas (CCE). Para a análise estatística, aplicaram-se os testes ANOVA, qui-quadrado, *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*. Resultados: Para todas as variáveis analisadas, não houve diferenças significativas na comparação entre os grupos nos dois tempos experimentais. Em 13 semanas ocorreu uma única lesão de CCE no grupo EEP. Em 20 semanas, a maior ocorrência de CCE também foi no grupo EEP. Conclusão: o EEP, com teor alcoólico de 30 %, favoreceu a reação tecidual da iniciação e da promoção da carcinogênese, por mecanismos ainda não elucidados.

Palavras-chave: própolis, carcinogênese, DMBA, língua, quimioprevenção

ABSTRACT

This dissertation consists of two papers, the first one is a review and the second is an original paper. In the first article, the authors reviewed the literature on cancer and propolis, addressing experimental carcinogenesis, chemically induced by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA), the chemical composition of propolis and its chemopreventive effects. The aim of the research paper was to evaluate the tissue response of tongue mucosa of *hamsters*, subjected to daily and alternating application of ethanolic extract of propolis (EEP) of a commercial presentation. Materials and methods: 60 *hamsters* were divided into three groups, and two experimental periods, 13 and 20 weeks. The lateral edge of the tongue underwent daily and alternate topical application of DMBA 0.5% and 30% EEP (EEP group, n = 20), DMBA and 0.5% aqueous extract of propolis (EAP) (EAP group; n = 20), and DMBA 0.5% saline (DMBA group, n = 20). The occurrence of types of clinical and histological changes was analysed. The area and volume of clinical changes, the occurrence of structural (AE) and cytological (CA) changes of squamous epithelial tissue with atypia and the histological area of squamous cell carcinoma (SCC) were measured. For statistical analysis, ANOVA, chi-square and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test were applied. Results: For all variables, there were no significant differences when comparing the groups in the two experimental periods. In 13 weeks, a single lesion of SCC in EEP group was observed. At 20 weeks, the highest occurrence of SCC was also in the group EEP. Conclusion: the EEP, with an alcohol content of 30% favored tissue reaction of initiation and promotion of carcinogenesis by mechanisms not yet elucidated.

Key words: propolis, carcinogenesis, DMBA, tongue, chemoprevention

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Variação do peso médio dos animais dos grupos EAP, EEP e DMBA ao longo das semanas..... 42
- Figura 2 Aspectos clínicos das alterações em mucosa lingual do tipo: (2A) placa branca (seta) grupo EAP e (2B) lesão exofítica (seta), grupo EEP, ambas de 13 semanas; (2C e 2D) lesões exofíticas (setas), do grupo EEP, de 20 semanas..... 44
- Figura 3 Aspectos histológicos, em 13 semanas de: (3A) tecido epitelial escamoso com hiperplasia (estrela) e hiperqueratose (seta), grupo DMBA, com ausências de AE e AC, (HE, 100x); (3B) DEE discreta, grupo EAP, (HE, 200x); (3C) DEE severa, grupo EEP, com pérola de ceratina (seta) e ceratinização celular prematura (HE, 200x); (3D) DEE severa, grupo DMBA, com ceratinização celular prematura (estrelas) (HE, 100x)..... 46
- Figura 4 Aspectos histológicos, em 20 semanas de: (4A) CCE bem diferenciado, grupo EEP, crescimento exofítico (HE, 40x e 200x); (4B) CCE moderadamente diferenciado, grupo EAP, crescimento endofítico, com envolvimento de quase toda a língua (HE, 40x e 400x)..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teor total de polifenóis e flavonoides presentes em EEP, EAP e nos extratos secos obtidos a partir destes extratos.....	39
Tabela 2	Distribuição do aspecto clínico das alterações em mucosa lingual dos grupos EEP, EAP e DMBA, de 13 e 20 semanas.....	43
Tabela 3	Distribuição do aspecto histológico das alterações em mucosa lingual dos grupos EEP, EAP e DMBA, em 13 e 20 semanas....	45
Tabela 4	Distribuição dos aspectos histológicos dos CCE em mucosa lingual dos grupos EEP, EAP e DMBA, de 13 e 20 semanas.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas do artigo de revisão, em ordem de aparecimento no texto

DMBA	9,10-dimetil-1,2-benzantraceno
DNA	ácido desoxirribonucleico
mg/100g	miligrama por 100 gramas
µg	micrograma
ml	mililitro
ROS	espécies reativas de oxigênio
EAP	extrato aquoso de própolis
EEP	extrato etanólico de própolis
DMSO	dimetilsulfóxido
nmol	nanomol
TPA	12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato
CAPE	éster fenetil do ácido cafeico
µl	microlitro
DHPN	2,2'dihidroxi-di- <i>n</i> -propilnitrosamina
mg/kg,	miligrama por quilograma
DMH	1,2-dimetilhidrazina
BBN	N-butil-N-[4-hidroxibutil]nitrosamina
ESP	extrato supercrítico de própolis
mg	miligrama
GSH	glutaciona reduzida
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas do artigo de pesquisa, em ordem de aparecimento no texto

DMBA	9,10-dimetil-1,2-benzantraceno
EEP	extrato etanólico de própolis
EAP	extrato aquoso de própolis
AE	alterações estruturais
AC	alterações citológicas
CEE	carcinoma de células escamosas
DEE	displasia epitelial escamosa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
g	grama
cm	centímetro
g/ml	grama por mililitro
mg/ml	miligrama por mililitro
mg/g	miligrama por grama
g/l	grama por litro
A	área
π	$\pi=3,1416$
V	volume
mg/kg	miligrama por quilograma
HE	hematoxilina e eosina
WHO	World Health Organization
OMS	Organização Mundial da Saúde
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
mm ²	milímetro quadrado
mm ³	milímetro cúbico
DNA	ácido desoxirribonucleico
EEPV	extrato etanólico de própolis verde

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
1.1	Referências.....	16
2	ARTIGO DE REVISÃO	18
2.1	Resumo.....	19
2.2	Introdução.....	20
2.3	Carcinogênese química experimental.....	21
2.4	Própolis.....	25
2.5	Efeitos biológicos da própolis na carcinogênese.....	27
3	ARTIGO DE PESQUISA	34
3.1	Resumo.....	35
3.2	Introdução.....	36
3.3	Materiais e métodos.....	38
3.3.1	Ética.....	38
3.3.2	Amostra.....	38
3.3.3	Químicos.....	39
3.3.4	Protocolo experimental.....	39
3.3.5	Análise estatística.....	41
3.4	Resultados.....	42
3.5	Discussão.....	48
3.6	Conclusão.....	51
3.6	Agradecimentos.....	52
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO	68
	BIOGRAFIA	70



1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), em 2009, 770 mil pessoas morreram devido ao câncer. Destes, 271 mil casos de cânceres, ocorreram em cavidade bucal, sítio anatômico cuja prevalência ocupa o sexto lugar no ranking mundial. Nos países mais desenvolvidos, a tendência é que o câncer passe a ser a principal causa de morte (HERON, 2011).

O modelo de carcinogênese experimental induzida pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) tem sido associado ao emprego de substâncias-teste, como a própolis (ORSOLIĆ *et al.*, 2005), para que se possa verificar os seus efeitos quimiopreventivos. As ações antioxidante, antitumoral e imunomoduladora, principais efeitos quimiopreventivos da própolis promovidos pelos flavonoides e derivados do ácido cafeico, foram evidenciadas em diferentes pesquisas (BOSIO *et al.*, 2000; CASTALDO; CAPASSO, 2002; DAUGSH *et al.*, 2008). Tais compostos agem na neutralização de radicais livres, o que promove redução do estresse oxidativo (BOSIO *et al.*, 2000). Os extratos e compostos isolados de própolis empregados em tais pesquisas foram preparados, exclusivamente para esta finalidade (BOSIO *et al.*, 2000; CASTALDO; CAPASSO, 2002; ORSOLIĆ *et al.*, 2005) e não se encontram disponíveis à população.

Extratos de própolis são utilizados pela população em geral para alívio de inflamações de garganta, halitose e outros usos, por automedicação, já que é um fármaco liberado à venda sem receita médica

Uma vez que fármacos de uso tópico ou bochechos à base de álcool têm sido associados às alterações de mucosa da cavidade bucal (CARDOSO *et al.*, 2005), e

a incidência de câncer de língua em humanos tem aumentado (REDDY *et al.*, 2010) torna-se necessário avaliar a reação tecidual da mucosa lingual, submetida à indução de carcinogênese e tratada com extratos de própolis em apresentação comercial, pois, há extratos etanólico de própolis disponíveis para a comercialização, com teor alcoólico de 30 % que podem ser utilizados sem supervisão médica. Além disso, pessoas expostas a fatores de risco à carcinogênese como as com hábito de fumar e/ou de consumir bebidas alcoólicas, podem utilizar estes extratos devido à halitose e alguma sintomatologia em cavidade bucal ou orofaringe por meio da automedicação.

A presente dissertação consiste em dois artigos científicos, sendo um de revisão e outro de pesquisa. No primeiro artigo, foi realizada uma revisão da literatura sobre câncer e própolis, abordando a carcinogênese experimental, induzida quimicamente pelo DMBA, a composição química da própolis e de seus efeitos quimiopreventivos evidenciados em estudos *in vitro* e *in vivo*. O objetivo do artigo de pesquisa foi avaliar a reação tecidual da mucosa lingual de *hamsters*, submetida à aplicação tópica, diária e alternada de DMBA e extrato etanólico de própolis (EEP).

1.1 Referências*

BOSIO, K. et al. *In vitro* activity of propolis against Streptococcus pyogenes. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 174-177, Aug. 2000.

*Normas ABNT NBR 6023

CARDOSO, C.L.; PRADO, R.F.; TAVEIRA, L.A. Macroscopic and microscopic study of tissue response to oral antiseptics and its influence on carcinogenesis. **Journal of applied oral science**, Bauru, v. 13, n. 3, p. 286-290, July-Sept. 2005.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, suppl. 1, p. S1-S6, Nov. 2002.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 435-441, Dec. 2008.

HERON, M. Deaths: leading causes for 2007. **National vital statistics reports**, Hyattsville, v. 59, n. 8, p. 1-95, Aug. 2011.

ORSOLIĆ, N. et al. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 10, p. 1928-1933, Oct. 2005.

REDDY, V.M.; CUNDALL-CURRY, D.; BRIDGER, M.W. Trends in the incidence rates of tonsil and base of tongue cancer in England, 1985-2006. **Annals of Royal College of surgeons of England**, London, v. 92, n. 8, p. 655-659, Nov. 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2010**. Disponível em: <<http://www.who.int/whosis/whostat/2010/en/index.html>>. Acesso em 05 dez. 2011.



2 ARTIGO DE REVISÃO

CARCINOGENESE E PRÓPOLIS: UMA REVISÃO

Ricardo Lopes-Rocha^{1,4}, Poliana Ribeiro Barroso^{2,4}, Nádia Lages Lima^{3,4}, Flaviana Dornela Verli^{3,4}

^{1,4}Mestrando do Programa de Pós-graduação em Odontologia, ^{2,4}Graduanda em Farmácia, ^{3,4}Professoras do Departamento de Ciências Básicas, ⁴Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil. Endereço para correspondência: Dr^a Flaviana Dornela Verli, Laboratório de Patologia da UFVJM, Rua da Glória, 187 - Campus I, prédio 02, sala 22, CEP: 39100-000, Diamantina, MG, Brasil, E-mail: flavianaverli@gmail.com

2.1 Resumo

A própolis e seus componentes químicos isolados possuem substâncias quimiopreventivas devido às suas ações antioxidante e anticarcinogênicas. O modelo de carcinogênese quimicamente induzida pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) possibilita testar os efeitos de diferentes substâncias quimiopreventivas, tal como a própolis. Neste artigo, foi realizada uma revisão da literatura sobre câncer com ênfase em carcinogênese experimental induzida

quimicamente pelo DMBA, composição química da própolis e seus efeitos quimiopreventivos evidenciados em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Própolis, carcinogênese, DMBA.

2.2 Introdução

O mecanismo de indução do câncer pelo carcinógeno 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) em modelo animal baseia-se no aumento do estresse oxidativo da célula, que promove mutação no ácido desoxirribonucleico (DNA) e caracteriza a fase de iniciação da carcinogênese (DARCHUN; HADLER, 1956).

A própolis e seus componentes químicos isolados são substâncias que apresentam ações antiinflamatória (PAULINO et al., 2003; CHIRUMBOLO et al., 2011; BARROSO et al., 2011) antifúngica (QUINTERO-MORA et al., 2008), antibacteriana (FERNANDES JÚNIOR et al., 2005), antioxidante (PADMAVATHI et al., 2006a; ISLA et al., 2009) e anticarcinogênica (KIMOTO et al., 2000; ORSOLÍĆ et al., 2005). Os flavonoides, componentes químicos da própolis, são compostos fenólicos com um radical hidroxila diretamente ligado ao anel aromático, que favorecem o sequestro de radicais livres (BOSIO et al., 2000; PADMAVATHI et al., 2006a). Além dos flavonoides, outros compostos ativos são comumente encontrados em amostras de própolis, como os derivados do ácido cafeico, que possuem atividade imunomoduladora (BOSIO et al., 2000; CASTALDO; CAPASSO, 2002) A utilização de substâncias naturais, no combate ao câncer, em pesquisas, visa à busca de quimiopreventivos com menores efeitos colaterais (MONSUEZ et al., 2010).

A quimioprevenção consiste na utilização de substâncias que modulem ou inibam a carcinogênese por meio de mecanismos celulares e moleculares, tais como a neutralização dos radicais livres pelos antioxidantes (WANG et al., 2008), supressão da proliferação celular (ORSOLÍĆ et al., 2005), desencadeamento da apoptose em células neoplásicas (SCHULTE-HERMANN et al., 1997). O modelo de carcinogênese induzida quimicamente possibilita testar os efeitos de substâncias com potencial quimiopreventivo, como a própolis, em diversos órgãos (HUANG et al., 1996; MITAMURA et al., 1996; KIMOTO et al., 1999; KAWABE et al., 2000; KIMOTO et al., 2001; BAZO et al., 2002; PADMAVATHI et al., 2006a; PADMAVATHI et al., 2006b), entretanto, há poucos estudos *in vivo* de carcinogênese induzida por DMBA em mucosa lingual e tratados com própolis (CAVALCANTE et al., 2011). Neste artigo, foi realizada uma revisão da literatura sobre câncer e própolis, abordando a carcinogênese experimental induzida quimicamente pelo DMBA, a composição química da própolis e suas ações anticarcinogênicas evidenciadas em estudos *in vitro* e *in vivo*.

2.3 Carcinogênese química experimental

No final do século XVIII, observou-se aumento da incidência do câncer testicular em limpadores de chaminés. Uma das causas deste fato foi relacionada ao contato prolongado da bolsa escrotal com a fuligem e alcatrão presentes nas chaminés (OTTENEDER; LUTZ, 1999). A partir desta associação, várias substâncias carcinogênicas foram identificadas da fuligem ou do alcatrão provenientes da combustão incompleta de substâncias orgânicas que são compostos da classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como o benzopireno (OTTENEDER; LUTZ,

1999) e o DMBA (BERENBLUM; SHUBIK, 1949; ENGELBRETH-HOLM; IVERSEN, 1951). O isolamento químico de substâncias carcinogênicas possibilitou o estabelecimento do método da carcinogênese experimental química. A primeira pesquisa de carcinogênese induzida quimicamente foi realizada por Kennaway, Cook, Hieger e Mayneord em 1932 e eles utilizaram o carcinógeno, 1,2:5,6-dibenzantraceno, do grupo dos hidrocarbonetos ([No authors listed], 1947; BOYLAND, 1948). O DMBA, carcinógeno isolado a partir de resíduos da combustão incompleta de carvão mineral, petróleo ou tabaco, tem sido utilizado na indução da carcinogênese experimental em modelo animal (BERENBLUM; SHUBIK, 1949; ENGELBRETH-HOLM; IVERSEN, 1951).

As primeiras pesquisas com o DMBA tiveram por objetivo avaliar as vias de administração (BERENBLUM; SHUBIK, 1949; GEYER et al., 1953; DARCHUN; HADLER, 1956), os tipos de solventes (GEYER et al., 1951; DARCHUN; HADLER, 1956), as concentrações (ENGELBRETH-HOLM; IVERSEN, 1951) e frequência de administração (MORRIS, 1951) que variavam de acordo com o modelo animal e o órgão-alvo.

A taxa de ocorrência de carcinoma de mama, em ratas, está diretamente relacionada com a quantidade de carcinógeno administrado em uma única dose, pela via endovenosa. Com a administração de 1,25 mg/100g, em dose única de DMBA, a taxa de ocorrência de câncer de mama é de 80 %, sendo necessário um tempo experimental de 47 semanas. Com a dose de 5,2 mg/100g, a taxa de ocorrência atinge 90 %, em um período mais curto (19 semanas), e o número de lesões por animal é duas vezes maior (GEYER et al., 1953).

Para a indução de carcinoma cutâneo, a dose mínima de DMBA administrada topicamente deve ser de 150 µg, equivalente a 0,05 ml de DMBA diluído a 0,3 % em

acetona. Assim, o carcinógeno permanece no citoplasma das células e atua como iniciador. Quando as doses são menores, observa-se que o DMBA é completamente metabolizado pelas células (DARCHUN; HADLER, 1956).

A ocorrência de câncer induzido pela aplicação tópica de DMBA em mucosa da cavidade bucal de *hamsters* (MORRIS, 1951; EISENBERG, 1977; MAREFAT; SHKLAR, 1977) depende do tipo de solvente (MAREFAT; SHKLAR, 1977), concentração da solução, frequência semanal de aplicação e idade dos animais (MORRIS, 1951).

As lesões em mucosa lingual aparecem a partir da 13^a semana quando se realiza ulcerações por meio de lima endodôntica farpada previamente à aplicação tópica de DMBA 0,5 % em acetona, três vezes por semana. Tal metodologia pode ser utilizada em diferentes sítios anatômicos da mucosa lingual, como borda lateral, porção anterior média ou posterior do dorso ou ventre (FUJITA et al., 1973). Entretanto, está comprovado que a ocorrência das lesões é independente da realização das ulcerações antes da aplicação tópica do carcinógeno.

A mucosa da bolsa retrofaringeana de *hamsters*, quando submetida à aplicação tópica de DMBA 1,5 % em óleo mineral, apresenta intensa área de necrose, após duas aplicações e ocorre morte de animais antes do desenvolvimento do câncer. Com o uso da substância a 0,5 %, ocorre leve eritema e até necrose; a 0,1 %, apenas leve eritema e a 0,05 %, ausência clínica de alterações. Em relação à frequência semanal de aplicação, observa-se que ao se aplicar o DMBA 0,5 % três vezes por semana, o período de latência é menor ao ser comparado com a aplicação realizada duas vezes por semana. Em relação à idade, observa-se que os animais mais jovens, com três a nove semanas de vida, são mais susceptíveis ao aparecimento de lesões (MORRIS, 1951). Quando o diluente do DMBA é a acetona,

o período de latência para o surgimento de lesões cancerosas é menor ao se utilizar a concentração de 0,5 % (MAREFAT; SHKLAR, 1977).

A aplicação tópica de DMBA em bolsa retrofaringeana, três vezes por semana, promove a indução de lesões displásicas a partir da décima semana, e de lesões cancerosas a partir da 13ª semana (EISENBERG, 1977). Em língua, as lesões cancerosas aparecem a partir da 13ª semana (FUJITA et al., 1973).

Após o início da ocorrência das alterações displásicas, o processo de carcinogênese continua, mesmo com a interrupção da aplicação do carcinógeno, e o câncer é evidenciado em todos os animais. Quando a aplicação tópica de DMBA 0,5 % em óleo mineral, em bolsa retrofaringeana, ocorre três vezes por semana, com interrupção das aplicações na décima semana, as alterações evidenciadas clínica e histologicamente são: leucoplasia, eritema, hiperkeratose, acantose, pleomorfismo nuclear, com diagnóstico de displasia. Nas 13ª e 15ª semanas, as lesões são maiores e apresentam áreas com necrose, além de leucoplasia, eritema e tumefação, com diagnóstico de carcinoma (EISENBERG, 1977).

Na década de 1970, o modelo de carcinogênese induzida por DMBA foi estabelecido (EISENBERG, 1977) por ser capaz de desencadear a iniciação, promoção e progressão do câncer (BERENBLUM; SHUBIK, 1949; MORRIS, 1951; GEYER et al., 1953; DARCHUN; HADLER, 1956) A metabolização do DMBA pelas células promove a formação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de outros metabólitos (DARCHUN; HADLER, 1956) que interagem quimicamente com o DNA, por meio de ligações covalentes, gerando os adutos carcinogênicos. Este processo é conhecido por estresse oxidativo (WANG et al., 2008). As interações do DMBA e seus metabólitos com o DNA oxidam as suas bases nitrogenadas e promovem mutações, caracterizando a fase de iniciação da

carcinogênese. Quando há mitose das células mutadas pelo carcinógeno, é estabelecida a fase de promoção da carcinogênese (FRENKEL et al., 1995). As fases supracitadas são sequenciais e essenciais na indução do câncer (SCHULTE-HERMANN et al., 1994).

O modelo de carcinogênese induzida quimicamente em animais possibilita verificar os efeitos de substâncias com potencial quimiopreventivo, tais como a vitamina D₃ (MEIER et al., 2007), chá verde (LI et al., 1999), chá preto (LETCHOUMY et al., 2007), o (6)-paradol, componente fenólico do gengibre (SURESH et al., 2005) e própolis (HUANG et al., 1996; MITAMURA et al., 1996; KIMOTO et al., 1999; KAWABE et al., 2000; KIMOTO et al., 2000; KIMOTO et al., 2001; BAZO et al., 2002; ORSOLÍĆ et al., 2005; PADMAVATHI et al., 2006a; PADMAVATHI et al., 2006b; CAVALCANTE et al., 2011). Por meio destas pesquisas, que buscam novas substâncias com efeitos quimiopreventivos, visa-se complementar o tratamento do câncer (CAVALCANTE et al., 2011).

2.4 Própolis

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas *Apis mellifera* a partir de resinas vegetais com objetivo de impermeabilização e proteção da colméia contra fungos e bactérias (BANKOVA, 2005; DUAILIBE et al., 2007). Além disso, a própolis é utilizada para compor a parede dos favos de mel e embalsamar os insetos invasores mortos, o que evita a decomposição dos mesmos (BANKOVA, 2005). O conceito e a função da própolis estão de acordo com a etimologia da palavra, uma vez que no grego, *pro* = em favor de; *polis* = cidade, ou seja, proteção à cidade das abelhas (FERREIRA et al. 2010).

A própolis *in natura* tem uma taxa aproximada de 50 % de resinas vegetais, 30 % de cera de abelha, 10 % de óleos aromáticos essenciais, pólen e outras matérias orgânicas (GHISALBERT, 1979). Atualmente, há mais de 300 compostos químicos identificados em amostras de própolis de diferentes origens geográficas (KHALIL, 2006), como os álcoois, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavanonas, flavonoides, ésteres de hidrocarboidratos, ácidos graxos, cetonas, terpenoides e derivados, esteroides, açúcares e compostos inorgânicos. As variações sazonais influenciam na composição e nas propriedades biológicas da própolis (NUNES et al., 2004; KHALIL, 2006; LI et al., 2010).

A maceração é o método físico utilizado para extrair as substâncias químicas da própolis *in natura* e consequente obtenção de extrato. Durante este processo, as amostras de própolis, finamente fragmentadas, são imersas em um solvente que dilui os seus componentes químicos, separando-os da cera (CUNHA et al., 2004; TRUSHEVA et al., 2007; PRATSINIS et al., 2010). A solução, constituída pelos compostos extraídos da própolis fragmentada, cera e o solvente, é filtrada e submetida à liofilização, processo de desidratação a frio, resultando em um extrato seco. Posteriormente, o extrato seco é diluído em um novo solvente, como água para obter extrato aquoso de própolis (EAP) ou etanol, para obter extrato etanólico de própolis (EEP) (CUNHA et al., 2004). Outros solventes como metanol (LI et al., 2009) ou clorofórmio (BANSKOTA et al., 2002) também podem ser utilizados. O extrato preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) é utilizado para aplicação em culturas de células, em estudos *in vitro* (ISHIHARA et al., 2009).

Durante o processo de maceração, variáveis químicas, como a concentração do solvente (CUNHA et al., 2004) ou físicas, como aquecimento e vibração

(TRUSHEVA et al., 2007), podem influenciar a qualidade e quantidade dos componentes químicos presentes nos extratos de própolis (CUNHA et al., 2004; TRUSHEVA et al., 2007).

A administração de extratos de própolis ou de seus componentes químicos, como substâncias-teste, em estudos *in vitro* de cultura de células cancerosas (WENG et al., 2005; ISHIHARA et al. 2009) e *in vivo* na carcinogênese induzida quimicamente em modelo animal (HUANG et al., 1996; MITAMURA et al., 1996; KIMOTO et al., 1999; KAWABE et al., 2000; KIMOTO et al., 2000; KIMOTO et al., 2001; BAZO et al., 2002; ORSOLIĆ et al., 2005; PADMAVATHI et al., 2006a; PADMAVATHI et al., 2006b; CAVALCANTE et al., 2011) ou por introdução de células cancerosas (INOUE et al., 2008; DEMESTRE et al., 2009; MESSERLI et al., 2009), tem por finalidade avaliar os efeitos quimiopreventivos da própolis. Em estudos *in vivo* de carcinogênese química induzida em animal, a substância-teste pode ser aplicada após a indução do câncer (HUANG et al., 1996; MITAMURA et al., 1996; KIMOTO et al., 1999; KAWABE et al., 2000; KIMOTO et al., 2000; KIMOTO et al., 2001; BAZO et al., 2002; ORSOLIĆ et al., 2005; PADMAVATHI et al., 2006a; PADMAVATHI et al., 2006b; XU et al., 2010) ou concomitantemente ao processo de indução, por meio de aplicações alternadas (SURESH et al., 2010; CAVALCANTE et al., 2011).

2.5 Efeitos biológicos da própolis na carcinogênese

Desde a antiguidade, a própolis tem sido utilizada em feridas e infecções pelos sacerdotes egípcios, médicos gregos e romanos, e povos sul americanos devido aos seus efeitos biológicos antifúngico (QUINTERO-MORA et al., 2008), e

antibacteriano (FERNANDES JÚNIOR et al., 2005). A própolis apresenta outros efeitos biológicos, tais como: efeito antiviral (FAN et al., 2011), antiinflamatório (PAULINO et al., 2003; BARROSO et al., 2011; CHIRUMBOLO et al., 2011), antialérgico (CHIRUMBOLO et al., 2011), imunomodulador (IVANOVSKA et al., 1995; BOSIO et al., 2000; CASTALDO; CAPASSO, 2002), antioxidante (PADMAVATHI et al., 2006a; ISLA et al., 2009) e anticarcinogênico (KIMOTO et al., 2000; ORSOLIĆ et al., 2005).

As ações quimiopreventivas da própolis nos estudos *in vitro* são verificadas pela mensuração do seu potencial de citotoxicidade, da taxa de apoptose e pela inibição do crescimento celular em cultura de células cancerosas de humanos (ISHIHARA et al., 2009) ou de animais (WENG et al., 2005). A mensuração da citoproteção, realizada após a administração da própolis em culturas de células normais e cancerosas, é outro método que pode ser utilizado para verificar o seu potencial quimiopreventivo (NAJAFI et al., 2007). Para os métodos supracitados, os extratos (NAJAFI et al., 2007; SAID et al., 2010), componentes químicos isolados (WANG et al. 2008; LI et al., 2010), ou ambas apresentações da própolis (ORSOLIĆ et al., 2005) podem ser empregados.

Nos estudos *in vivo*, o efeito quimiopreventivo da própolis associada à indução de câncer tem sido observado por meio da mensuração da taxa de sobrevivência dos animais (ORSOLIĆ et al., 2003), menor crescimento da lesão presente no órgão acometido (KIMOTO et al., 2000; ORSOLIĆ et al., 2005) ou aumento da ocorrência de apoptoses (LI et al., 2009). A eficácia da ação quimiopreventiva é observada quando há menor perda de peso corpóreo associada ao menor desenvolvimento de lesões cancerosas em diversos órgãos-alvo, tais como: fígado (SAID et al., 2010), cólon (BORRELLI et al., 2002), pulmão (KIMOTO

et al., 2001; ORSOLIĆ et al., 2005), mama (PADMAVATHI et al., 2006a), pele (HUANG et al., 1996; MITAMURA et al., 1996), rim, bexiga, tireoide (KIMOTO et al., 1999) e baço (KAWABE et al., 2000).

Algumas pesquisas com própolis associada à carcinogênese química induzida por DMBA, em modelo animal, são descritas a seguir.

Huang e colaboradores (1996) induziram carcinoma em pele de ratos pela aplicação tópica de dois carcinógenos diluídos em acetona, 200 nmol de DMBA e cinco nmol de 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Na primeira semana, o DMBA, por ser iniciador, foi aplicado em todos os grupos; exceto no grupo controle, em que a substância aplicada foi acetona. Em seguida, realizou-se a aplicação de TPA e éster fenetil do ácido cafeico (CAPE), um dos componentes químicos isolados da própolis, duas vezes por semana, durante 19 semanas. Para cada grupo experimental, as doses de CAPE aplicadas foram de um, dez, 100 e 3000 nmol, respectivamente. Os resultados mostraram que o CAPE apresentou maior efeito quimiopreventivo nos animais tratados com a dose de 3000 nmol de CAPE, devido à redução do número dos carcinomas de células escamosas papiliformes cutâneos em 70 % e também do tamanho deles em 74 %. Os autores concluíram que o CAPE apresenta potencial inibidor na fase de promoção da carcinogênese cutânea em ratos.

Mitamura e colaboradores (1996) isolaram um novo tipo de clerodane diterpenoide (PMS-1), do extrato metanólico da própolis brasileira e verificaram o seu potencial quimiopreventivo em carcinoma cutâneo. A indução do carcinoma foi por meio da aplicação tópica de 100 µl de DMBA 0,3 % em acetona, duas vezes por semana, durante dez e 20 semanas. No grupo teste, o clerodane diterpenoide a 3 % em DMSO foi aplicado topicamente quatro vezes por semana. Os resultados

mostraram que no grupo controle as primeiras lesões cutâneas surgiram na quarta semana e atingiram o pico de incidência na sexta semana. Já no grupo teste, houve surgimento de lesões cutâneas na quinta semana e o pico de incidência foi na décima semana. Os autores concluíram que o clerodane diterpenoide (PMS-1) aumenta o período de latência, reduz a incidência e o tamanho de lesões cutâneas pela inibição da síntese de DNA e supressão do crescimento tumoral.

Kimoto e colaboradores (1999) induziram quimicamente adenocarcinoma mamário em ratas F-344 por meio de três carcinógenos iniciadores, 2,2'-dihidroxi-di-*n*-propilnitrosamina (DHPN) 750 mg/kg, DMBA e 1,2-dimetilhidrazina (DMH) 40 mg/kg, que foram administrados durante as três primeiras semanas, além de um carcinógeno promotor, N-butil-N-[4-hidroxibutil]nitrosamina (BBN) 0,05 %, em água durante 33 semanas. Uma vez que o extrato supercrítico de própolis (ESP), obtido por meio de ácido carbônico líquido, contém maior quantidade de diterpenos e menor teor de flavonoides que o EEP, o objetivo da pesquisa foi verificar os efeitos quimiopreventivos do ESP em lesões induzidas em glândula mamária e em outros órgãos por meio de análise clínica, macroscópica e histológica. Após a administração dos carcinógenos iniciadores, ESP a 0,1 % e 0,01 % foram administrados na dieta, durante 33 semanas, juntamente com o BBN, para cada um dos grupos-teste. Os resultados mostraram que a incidência e multiplicidade de adenocarcinoma mamário foram menores no grupo tratado com ESP a 0,01 %. Em outros órgãos, como o fígado, bexiga e glândula tireoide, houve maior incidência de lesões, no grupo tratado com ESP a 0,1 %. Os autores concluíram que a menor dose de ESP reduz a incidência de adenocarcinoma mamário, e, a maior dose ter sido causa de maior incidência de lesões em outros órgãos, como, fígado, bexiga e tireoide.

Kawabe e colaboradores (2000) induziram adenocarcinoma mamário, em ratas F-344, por meio da administração dos carcinógenos DMH, DMBA e DHPN. Na primeira semana, por cinco vezes, foi administrado 40 mg/kg de DMH e uma única dose de 40 mg/kg de DMBA no último dia desta semana. O DHPN 0,1 % em água foi administrado nas duas semanas seguintes. Entre a quarta e 39ª semana, os EEP e EAP 0,1 %, ambos oriundos do Brasil e Uruguai, foram administrados na dieta dos grupos-teste. Houve menor incidência de adenocarcinoma mamário nos grupos tratados com EEP oriundos do Brasil e do Uruguai. Entretanto, houve menor multiplicidade deste tipo de câncer nas ratas tratadas com o EEP uruguaio. Os autores concluíram que o EEP uruguaio apresenta potencial de inibição da carcinogênese após a fase de iniciação.

O potencial antineoplásico de extrato seco de EEP foi testado por Padmavathi e colaboradores (2006b) associado à administração de paclitaxel, em modelo de carcinogênese induzida por DMBA, em glândula mamária de ratas. O paclitaxel é uma substância utilizada na quimioterapia do adenocarcinoma mamário. A indução da carcinogênese foi por meio de 20 mg de DMBA, diluído em óleo de girassol e soro fisiológico. O grupo-teste foi tratado com uma dose semanal de 33 mg/kg de paclitaxel, por via intraperitoneal durante quatro semanas e 50 mg/kg de extrato de própolis via oral durante todo o período experimental. Os espécimes foram submetidos à análise da atividade metabólica pela quantificação das enzimas hepáticas, responsáveis pelo metabolismo do carcinógeno, tanto na fase de iniciação (fase I) quanto de promoção (fase II) da carcinogênese. Os resultados mostraram aumento significativo das enzimas da fase I em animais com adenocarcinoma mamário. Portanto, houve significativo retorno dos níveis das enzimas hepáticas em animais tratados com o extrato de própolis. Concluiu-se que o

extrato de própolis, associado à terapia com paclitaxel, apresenta efeito protetor, podendo assim, ser considerado um quimiopreventivo.

Em outra pesquisa, Padmavathi e colaboradores (2006a) realizaram a administração de extrato seco de própolis associada ao paclitaxel, após 90 dias da indução da carcinogênese em glândula mamária. Os resultados mostraram que as ratas tratadas apresentavam maior peso médio corporal e menor peso médio dos adenocarcinomas. Pela análise bioquímica de fragmentos destas lesões, observou-se que houve diminuição da peroxidação lipídica. Esse efeito ocorreu devido ao aumento das atividades antioxidantes, promovidas por substâncias enzimáticas, tais como: dismutase peroxidase, catalase, glutadiona peroxidase e não-enzimáticas, como glutathione reduzida (GSH), vitamina C e E. Os autores sugerem que o extrato de própolis reduz os efeitos tóxicos gerados pela quimioterapia do paclitaxel, por meio de sua ação antioxidante. Concluíram que a administração de ambas as substâncias são capazes de suprimir a carcinogênese, devido à redução da peroxidação lipídica celular evidenciada pelo aumento de enzimas antioxidantes.

Cavalcante e colaboradores (2011) avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis verde associado à carcinogênese química induzida em língua de ratos. O DMBA foi administrado topicamente, três vezes por semana, alternadamente com o extrato testado em dosagens de 100, 200 e 300 mg/kg pela via oral, pelo método de gavagem. A solução testada apresentava a concentração de 41 % de extrato seco e de $0,95 \pm 0,44$ % de flavonoides. As lesões encontradas foram classificadas de acordo com o sistema de classificação histológica proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os autores concluíram que o extrato etanólico de própolis verde testado é eficaz na proteção durante o processo de carcinogênese induzida por DMBA em língua e a mesma foi associada à concentração do extrato. Além

disso, a classificação histológica proposta pela OMS é um método confiável para estabelecer os graus de displasia epitelial induzida por DMBA.

Para futuras pesquisas, a classificação de displasia da OMS (GALE et al., 2005) e do grau histológico de malignidade dos carcinomas de células escamosas, proposta por Johnson e colaboradores (2005) podem ser utilizados durante a análise histológica de displasias e carcinomas induzido por DMBA.

O câncer é uma das doenças que apresenta alto índice de morbidade e mortalidade, acometendo vários órgãos. Devido a isso, há necessidade da descoberta de novas substâncias que apresentem efeitos quimiopreventivos na carcinogênese. Compostos químicos isolados da própolis, ou própolis na forma de extrato apresentam ações quimiopreventivas comprovadas em diversos estudos *in vitro*, entretanto, há poucos estudos *in vivo* de carcinogênese induzida em mucosa lingual apesar do aumento dos índices de câncer de língua ocorrido nos últimos anos.



3 ARTIGO DE PESQUISA

RESPOSTA TECIDUAL DA MUCOSA LINGUAL SUBMETIDA À CARCINOGENESE EXPERIMENTAL E TRATADA COM EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Ricardo Lopes-Rocha^{1,4}, Poliana Ribeiro Barroso^{2,4}, Fernanda Ferreira Oliveira^{3,4},
Nádia Lages Lima^{3,4}, Flaviana Dornela Verli^{3,4}

¹Mestrando do Programa de Pós-graduação em Odontologia, ²Graduanda em Farmácia, ³Professoras do Departamento de Ciências Básicas, ⁴Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil. Endereço para correspondência: Dr^a Flaviana Dornela Verli, Laboratório de Patologia da UFVJM, Rua da Glória, 187 - Campus I, prédio 02, sala 22, CEP: 39100-000, Diamantina, MG, Brasil, E-mail: flavianaverli@gmail.com

3.1 Resumo

Este foi um estudo semiexperimental, *in vivo*, randomizado, quantitativo. **Objetivo:** avaliar a reação tecidual da mucosa lingual de *hamsters*, submetida à aplicação tópica, diária e alternada de 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) e extrato etanólico de própolis (EEP) de uma apresentação comercial. **Materiais e métodos:** Sessenta *hamsters* foram divididos em três grupos, com dois períodos experimentais, 13 e 20 semanas. A borda lateral da língua foi submetida à aplicação

tópica, diária e alternada de DMBA 0,5 % e EEP 30 % (grupo EEP, n = 20), DMBA 0,5 % e extrato aquoso de própolis (EAP) (grupo EAP, n = 20), DMBA 0,5 % e soro fisiológico (grupo DMBA, n = 20). Realizou-se análise da ocorrência dos tipos de alterações clínicas e histológicas. Além disso, mensurou-se a área e volume das alterações clínicas, a ocorrência das alterações estruturais (AE) e citológicas (AC) do tecido epitelial escamoso com atipias e a área histológica dos carcinomas de células escamosas (CCE). Para a análise estatística, aplicaram-se os testes ANOVA, qui-quadrado, *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*. **Resultados:** Para todas as variáveis analisadas, não houve diferenças significativas na comparação entre os grupos nos dois tempos experimentais. Em 13 semanas ocorreu uma única lesão de CCE no grupo EEP. Em 20 semanas, a maior ocorrência de CCE também foi no grupo EEP. **Conclusão:** o EEP, com teor alcoólico de 30 %, favoreceu reação tecidual da iniciação e da promoção da carcinogênese, por mecanismos ainda não elucidados.

Palavras-chave: própolis, carcinogênese, DMBA, língua, quimioprevenção

3.2 Introdução

A indução de câncer pelo carcinógeno 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) se encontra estabelecida (GEYER et al., 1953; DARCHUN; HADLER, 1956; CAVALCANTE et al., 2011). O DMBA pertence à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que são subprodutos da combustão de cigarro ou de outras substâncias orgânicas (CAMPBELL; LINDSEY, 1956; RUBIN, 2001). Em modelos animais, o DMBA ao ser administrado por aplicação tópica (LI et al., 1999; CAVALCANTE et al., 2011), promove o surgimento de lesões displásicas, a partir da décima semana e de câncer a partir da 13^a semana (EISENBERG, 1977). Tais

lesões, em bolsas retrofaringeana de *hamsters*, apresentam alterações morfológicas semelhantes às que ocorrem em tecido epitelial escamoso da mucosa bucal de humanos (NAGINI, 2009). Atualmente, o modelo de carcinogênese experimental induzida por DMBA tem sido associado ao emprego de substâncias-teste, como a própolis (ORSOLÍĆ et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2011), para que se possa verificar os seus efeitos quimiopreventivos.

A própolis e seus compostos químicos isolados tem sido testados devido às suas ações antioxidante, antitumoral e imunomoduladora (KIMOTO et al., 2001; ORSOLÍĆ et al., 2005; YASUI et al., 2008; CAVALCANTE et al., 2011), promovidas pelos seus componentes químicos, como os flavonoides e ácido cafeico (CASTALDO; CAPASSO, 2002; SILVA et al., 2007), que agem na neutralização de radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo (WANG et al., 2008). Os extratos e compostos isolados de própolis, empregados na maioria das pesquisas (KIMOTO et al., 2001; ORSOLÍĆ et al., 2005; YASUI et al., 2008; CAVALCANTE et al., 2011), são preparados exclusivamente para as mesmas e não estão disponíveis no comércio, porém há extratos etanólicos de própolis liberados à comercialização sem receita médica (BRASIL, 2001) que podem ser utilizados pela população em geral para alívio de inflamações de garganta, halitose e outros usos, por automedicação e que já demonstraram possuir ação antiinflamatória (BARROSO et al., 2011).

Uma vez que fármacos à base de álcool, de uso tópico ou bochechos (CARDOSO et al., 2005), soluções de álcool (ELZAY, 1966; SEITZ; STICKEL, 2009) têm sido associados às alterações morfológicas da mucosa bucal e a incidência de câncer de língua em humanos tem aumentado (REDDY et al., 2010), pessoas expostas a fatores de risco à carcinogênese como as com hábito de fumar e/ou de consumir bebidas alcoólicas, podem utilizar EEP para alívio da halitose ou de

alguma sintomatologia em cavidade bucal ou orofaringe por automedicação, aumentando o risco potencial de desenvolver câncer bucal.

Devido os fatos supramencionados, a presente pesquisa tem por objetivo avaliar a resposta tecidual da mucosa lingual de *hamsters*, submetida à aplicação tópica, diária e alternada de DMBA e de EEP com teor alcoólico de 30 %, de uma apresentação comercial.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Ética

O uso de animais nesta pesquisa está em concordância com a prática da legislação nacional e internacional e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), protocolo 004/2010 (ANEXO).

3.3.2 Amostra

A amostra foi constituída por 60 *hamsters*, machos e fêmeas (*Mesocricetus auratus*), com 90 dias de idade e peso médio de 126,8 g \pm 14,26 g. Os animais foram obtidos do biotério do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), climatizados em nosso laboratório por 14 dias e mantidos em condições de temperatura ambiente, sob ciclos de luz de 12 horas de claro e escuro, em gaiolas plásticas (60 x 50 x 22 cm), com livre acesso à ração balanceada (Nuvilab CR1, Nuvital[®], Colombo, Paraná, Brasil) e água. Cada gaiola continha no máximo quatro animais, eram forradas com maravalha e a limpeza das mesmas ocorria duas vezes por semana.

3.3.3 Químicos

O carcinógeno DMBA (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) foi diluído em acetona para obter uma solução com concentração de 0,5 %. O EEP e o EAP (extrato aquoso de própolis) foram adquiridos de um mesmo fabricante (Apiário Mackllani[®] Ltda, Santa Bárbara, Minas Gerais, Brasil), no comércio local e utilizados sem diluição. De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, os EEP e EAP foram produzidos a partir de 11,56 % g/ml de extrato seco de própolis brasileira. O teor alcóolico do EEP foi de 30 %.

Em laboratório, foi realizada a mensuração do teor total de polifenóis e flavonoides dos extratos EEP e EAP utilizados nesta pesquisa e dos extratos secos obtidos a partir destes extratos. A mensuração do teor total de polifenóis das amostras de EEP e EAP foi feita de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). O teor total de flavonoides foi mensurado pelo método descrito por Park e colaboradores (1995) (Tabela 1).

Tabela 1 - Teor total de polifenóis e flavonoides presentes em EEP, EAP e nos extratos secos obtidos a partir destes extratos

Extratos	Teor total de polifenóis		Teor total de flavonoides		Antocianinas
	(mg/ml)	(mg/g)*	(mg/ml)	(mg/g)**	
Solução					
EEP [®]	19,52 ± 0,07	-	19,06 ± 0,64	-	1,61 ± 0,25
EAP [®]	8,87 ± 0,10	-	6,90 ± 0,10	-	ND
Secos***					
EEP [®]	-	117,16	-	114,4	-
EAP [®]	-	89,63	-	69,73	-

*Polifenóis (g/l) equivalentes de gálico

**Flavonoides (g/l) equivalente de quercetina

***Os extratos secos foram obtidos a partir da liofilização de extratos de EEP e EAP, ambos de uma mesma apresentação comercial

® - Apiário Mackllani Ltda, Santa Bárbara, Minas Gerais, Brasil

3.3.4 Protocolo experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, subdivididos em dois tempos experimentais, 13 e 20 semanas. As substâncias testadas em cada

grupo experimental foram: DMBA 0,5 % e EEP 30 % (grupo EEP; n = 20), DMBA 0,5 % e EAP (grupo EAP; n = 20), e DMBA 0,5 % e soro fisiológico (grupo DMBA; n = 20). As substâncias foram administradas topicamente sobre a borda lateral direita da língua, utilizando pincéis de pelo de camelo, número 1 (Tigre®, São Paulo, Brasil). A aplicação de DMBA foi alternada, a cada 24 horas, pela de EEP ou EAP, de acordo com o grupo. Em um dia da semana, não houve aplicação de substância. Cada aplicação tópica diária consistiu em quatro pinceladas consecutivas, com a remoção do excesso da substância do pincel, antes de cada pincelada, para que não houvesse deglutição das mesmas pelos animais.

Os animais foram pesados individualmente nas 1^a, 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, 11^a, 13^a, 15^a, 17^a e 19^a semanas. Um dia anterior à eutanásia de cada tempo experimental, realizou-se a análise dos aspectos clínicos das alterações em mucosa lingual. Os tipos de alterações clínicas evidenciadas de acordo com Lima e Taveira (1999) modificada foram: eritematosa difusa ou esbranquiçada difusa, ambas alterações de cor avermelhada ou branca; placa branca, caracterizada por ser uma elevação, plana, branca, bem circunscrita; esbranquiçada e moriforme difusa, alteração de cor e textura com pequenas irregularidades arredondadas em uma superfície opacificada; placa verrucosa, caracterizada por ser uma elevação, plana, circunscrita, com superfície papilomatosa; lesão exofítica, massa nodular ou tumoral. Nas alterações do tipo placa, realizou-se a mensuração do comprimento (eixo x), da largura (eixo y) e da profundidade nas alterações do tipo lesões exofíticas (eixo z), por meio de um paquímetro (Jon[®], São Paulo, Brasil). Assim, a área das placas e o volume das lesões exofíticas foram calculados pelas respectivas fórmulas, $A=\pi.x/2.y/2$ e $V=3/4.\pi.xyz$.

Em cada tempo experimental, dez animais de cada grupo foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) associada à quetamina (200 mg/kg de peso corporal) para a eutanásia. Após a decapitação, as línguas foram dissecadas e fixadas em solução de formol a 10 % tamponado, por 48 horas. Os espécimes foram incluídos em parafina, cortados, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

A análise histológica foi realizada por um único examinador, utilizando um microscópio de luz (Olympus® BX 41, Shinjuku-Ku, Tokyo, Japan), em diferentes aumentos. As alterações histológicas encontradas foram classificadas de acordo com a presença e número de alterações estruturais (AE) e alterações citológicas (AC) (GALE et al., 2005). A classificação do grau das displasias epiteliais escamosas (DEE) com presença de AE e AC foi de acordo com os critérios de Katz e colaboradores (1985) e de Gale e colaboradores (2005). Para os carcinomas de células escamosas (CCE), o grau de malignidade foi classificado de acordo com a Johnson e colaboradores (2005). Nas DEE, a média da ocorrência das AE e AC presentes no epitélio foram calculadas. Nos CCE, a área histológica foi calculada por meio do programa *Motic Images Plus*, versão 2.0 (Motic® China Group CO. LTD. Copyright® 2007, Guiyang, China).

3.3.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados com o auxílio de um programa *SPSS*, versão 17.0 (SPSS® Inc, Chicago, Illinois, USA). Antes da aplicação de testes, foram realizados testes de normalidade. Para verificar o comportamento da variação do peso médio dos animais, durante o experimento, foi aplicado o teste *ANOVA* de medidas repetidas. Para análise da ocorrência dos tipos de alterações clínicas ou

histológicas entre grupos, foi aplicado o teste qui-quadrado. Os testes de *Kruskal-Wallis* ou de *Mann-Whitney* foram aplicados na análise das médias da ocorrência de AC, AE e da área histológica para comparação entre grupos.

3.4 Resultados

Ao longo das semanas, houve aumento de peso médio dos animais. Pelo teste *ANOVA* de medidas repetidas, observou-se que a variação deste aumento foi uma progressão linear significativa para os grupos EAP ($p=0,009$) e EEP ($p<0,001$). Enquanto que para o grupo DMBA, esta variação foi uma progressão quadrática significativa ($p<0,001$), com perda progressiva de peso a partir da 15ª semana (Figura 1).

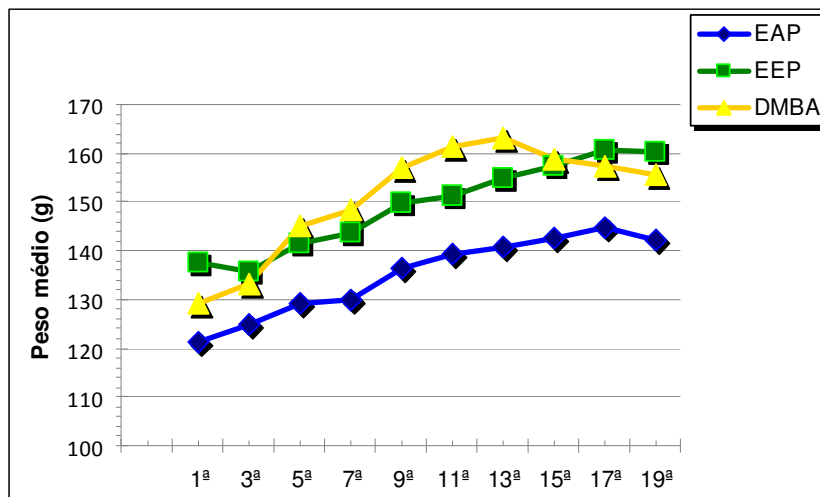


Figura 1 - Variação do peso médio dos animais dos grupos EAP, EEP e DMBA ao longo das semanas

A eutanásia foi realizada precocemente em um animal do grupo DMBA, na 18ª semana, por apresentar uma lesão extensa na língua e quadro de caquexia. E

em outro animal, do grupo EEP, na 19ª semana, devido a uma ferida extensa, no dorso, decorrente de disputa entre os animais. Ambos foram excluídos da amostra do exame clínico das lesões (Tabela 2). Para os diferentes tipos de alterações clínicas analisadas e suas respectivas médias de área ou volume, não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos, de 13 e 20 semanas (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição do aspecto clínico das alterações em mucosa lingual dos grupos EEP, EAP e DMBA, de 13 e 20 semanas

Tipo de alterações clínicas	Períodos experimentais							
	13 semanas				20 semanas			
	Grupo EEP	Grupo EAP	Grupo DMBA	Valor de p	Grupo EEP*	Grupo EAP	Grupo DMBA*	Valor de p
Eritematosa difusa n(%)	4(40)	3(30)	4(40)	0,866 ^a	0(0)	0(0)	0(0)	-
Esbranquiçada difusa n(%)	2(20)	3(30)	3(30)	0,843 ^a	0(0)	0(0)	0(0)	-
**Placa branca n(%)	2(20)	2(20)	2(20)	1,00 ^a	0(0)	0(0)	0(0)	-
Valor ou média e desvio padrão da A	3,92±2,22	12,75±4,16	0,785±0,00	0,095 ^b	-	-	-	-
Valor (mínimo-máximo) da A	(2,35-5,49)	(9,81-15,7)	(0,785-,785)	-	-	-	-	-
Esbranquiçada e Moriforme difusa n(%)	0(0)	0(0)	0(0)	-	5 (55,5)	3(30)	5(55,5)	0,430 ^a
**Placa verrucosa n(%)	1(10)	2(20)	1(10)	0,749 ^a	2(22,2)	4(40)	3(33,3)	0,706 ^a
Valor ou média e desvio padrão da A	5,49	8,04±3,60	4,71	0,325 ^b	10,20±7,77	12,16±14,67	5,75±3,26	0,700 ^b
Valor (mínimo-máximo) da A	0(0)	(5,49-10,59)	0(0)	-	(4,71-15,7)	(0,39-32,97)	(3,14-9,42)	-
***Lesão exofítica n(%)	1(10)	0(0)	0(0)	-	2(22,2)	3(30)	1(11,1)	0,604 ^a
Média ± desvio padrão do V	10,59	-	-	-	18,31±3,69	13,87±18,14	15,7	0,541 ^b
(mínimo-máximo) do V	10,59	-	-	-	(15,7-20,93)	(0,32-34,49)	15,7	-
Total (n=78)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	-	9(100%)*	10(100%)	9(100%)*	-

A=área em mm²; V=volume em mm³; ± = desvio padrão. * Houve morte de um animal do grupo EEP e outro do grupo DMBA, na semana anterior à análise clínica. **Lesões com área calculada pela fórmula $A = \pi \cdot x/2 \cdot y/2$. ***Lesões com volume calculado pela fórmula $V = 3/4 \cdot \pi \cdot xyz$

^aTeste Qui-quadrado

^bTeste de Kruskal-Wallis

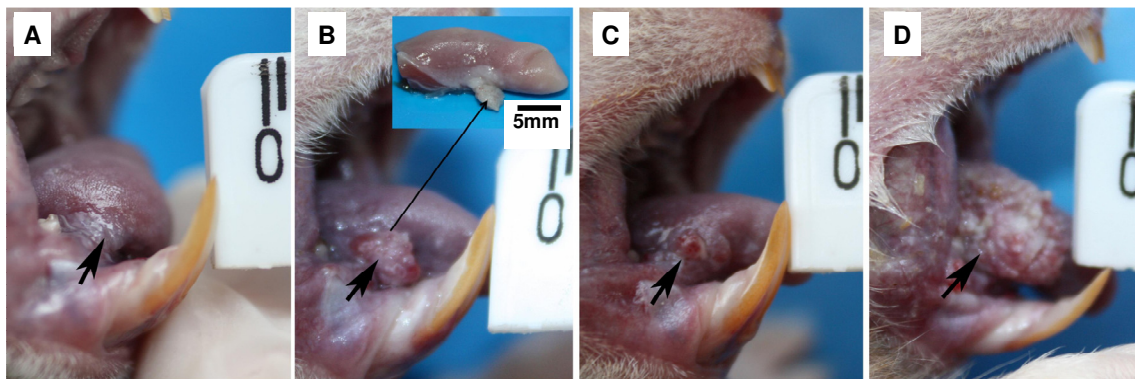


Figura 2 - Aspectos clínicos das alterações em mucosa lingual do tipo: (2A) placa branca (seta), grupo EAP e (2B) lesão exofítica (seta), grupo EEP, ambas de 13 semanas; (2C e 2D) lesões exofíticas (setas), do grupo EEP, de 20 semanas

Houve maior ocorrência de DEE discreta em 13 semanas para o grupo EAP entre grupos, pelo teste qui-quadrado ($p=0,044$) e tal significância não permaneceu pela comparação par a par pelo teste de Fisher (Tabela 3).

Em relação à ocorrência das alterações histológicas e das suas respectivas médias de AE e AC, entre os grupos, de 13 e 20 semanas, não houve diferenças significativas. (Tabela 3).

No período de 13 semanas, nas DEE discretas dos grupos EEP e EAP, ocorreram AE dos tipos: estratificação epitelial irregular, perda de polaridade, projeções epiteliais em forma de gota. Ocorreu ceratinização celular prematura apenas em um caso do grupo EAP. Nestas mesmas DEE discretas, todas as AC observadas no grupo EAP foram: aumento da proporção núcleo citoplasma, do número de núcleos e de seu tamanho e hiper cromasia (Figura 3B). Para o grupo EEP, houve aumento do tamanho celular e nuclear e do número de núcleos. No único caso de DEE moderada, do grupo DMBA, as AE observadas foram estratificação epitelial irregular com perda de polaridade, e as AC foram alteração do tamanho nuclear e celular, pleomorfismos e mitoses. Nas DEE severas, as AE mais comuns entre os grupos EAP e DMBA foram estratificação epitelial irregular, perda da polaridade da camada basal e ceratinização celular prematura (Figura 3C). Além

das AE dos grupos EAP e DMBA, no grupo EEP houve a presença de pérolas de ceratina e aumento do número de mitoses atípicas (Figura 3D). Nestas DEE severas, todas as AC do grupo DMBA foram aumento da proporção núcleo citoplasma, do número de núcleos e de seu tamanho, hipercromasia. As mitoses atípicas ocorreram nas DDE severas do grupo EAP.

Tabela 3 - Distribuição do aspecto histológico das alterações em mucosa lingual dos grupos EEP, EAP e DMBA, de 13 e 20 semanas

Tipo de alterações histológicas	Períodos experimentais							
	13 semanas				20 semanas			
	Grupo EEP	Grupo EAP	Grupo DMBA	Valor de p	Grupo EEP	Grupo EAP	Grupo DMBA	Valor de p
Hiperplasia e hiperqueratose com ausência de atipias $n(\%)$	6(60) ^a	4(40) ^a	6(60) ^a	0,585 ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	2(20) ^a	0,117 ^a
*DDE - Discreta $n(\%)$	1(10) ^{a,b}	4(40) ^{a,b}	0(0) ^{a,b}	0,044 ^{a#}	0(0) ^a	0(0) ^a	1(10) ^a	0,355 ^a
**Valor ou média das AE e AC e desvio padrão	3 ^c	4,25±0,95 ^c	-	0,264 ^c	-	-	3	-
Valor (mínimo-máximo)	-	(3-5)	-	-	-	-	-	-
*DDE - Moderada $n(\%)$	0(0) ^a	0(0) ^a	1(10) ^a	0,355 ^a	0(0)	0(0)	0(0)	-
*Valor ou média das AE e AC e desvio padrão	-	-	9	-	-	-	-	-
Valor (mínimo-máximo)	-	-	-	-	-	-	-	-
*DDE - Severa $n(\%)$	2(20) ^a	2(20) ^a	3(30) ^a	0,830 ^a	2(20) ^a	4(40) ^a	1(10) ^a	0,271 ^a
**Valor ou média das AE e AC e desvio padrão	16,5±3,53 ^d	14±2,82 ^d	12,66±3,15 ^d	0,481 ^d	19±7,07 ^d	11±0,81 ^d	19 ^d	0,101 ^d
Valor (mínimo-máximo)	(14-19)	(12-16)	(9-16)	-	(14-24)	(10-12)	-	-
CCE	1(10) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0,355 ^a	8(80) ^a	6(60) ^a	6(60) ^a	0,549 ^a
Total $n(\%)$	10(100)	10(100)	10(100)	-	10(100)	10(100)	10(100)	-

AE=alterações estruturais e AC=alterações citológicas; CCE=carcinomas de células escamosas; DDE=displasia epitelial escamosa. *A análise histológica do tecido epitelial escamoso com presença de AE e AC de acordo com os critérios de Gale *et al.*^[24] e de Katz *et al.*^[25]. **Valor ou média das AE e AC presentes nos terços basal, suprabasal e superficial. ^aTeste qui-quadrado entre os grupos EEP x EAP x DMBA. [#]Teste de Fisher para comparação par a par (EEP x EAP, $p=0,303$; EAP x DMBA, $p=0,087$; EEP x DMBA, $p=1,00$). ^cTeste de Mann-Whitney / ^dTeste de Kruskal-Wallis

Em 20 semanas, as AE presentes em um único caso de DEE discreta, do grupo DMBA, foram estratificação epitelial irregular e perda de polaridade. E nucléolos numerosos e aumentados de tamanho caracterizaram as AC. A única AE comum, entre todos os grupos com DEE severa, foi estratificação epitelial irregular; e entre os grupos EAP e DMBA, ceratinização celular prematura. Houve a ocorrência

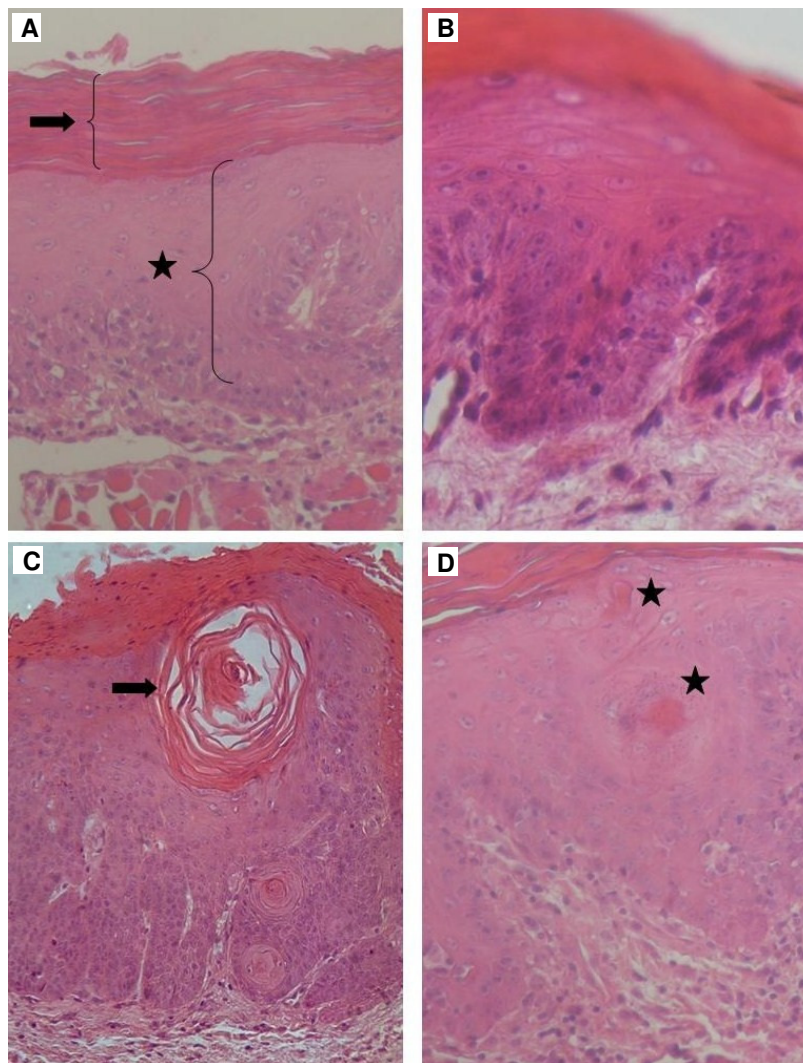


Figura 3 - Aspectos histológicos, em 13 semanas de: (3A) tecido epitelial escamoso com hiperplasia (estrela) e hiperqueratose (seta), grupo DMBA, com ausências de AE e AC, (HE, 100x); (3B) DEE discreta, grupo EAP, (HE, 200x); (3C) DEE severa, grupo EEP, com pérola de ceratina (seta) e ceratinização celular prematura (HE, 200x); (3D) DEE severa, grupo DMBA, com ceratinização celular prematura (estrelas) (HE, 100x)

de pérolas de ceratina no grupo DMBA e de aumento do número de mitoses no grupo EEP. Nas DEE severas do grupo EEP foram observadas todos os tipos de AC.

Para a ocorrência de CCE e suas respectivas médias de área histológica não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos, de 13 e 20 semanas. Em 20 semanas, a maior ocorrência de CCE foi observada no grupo EEP, com cresci-

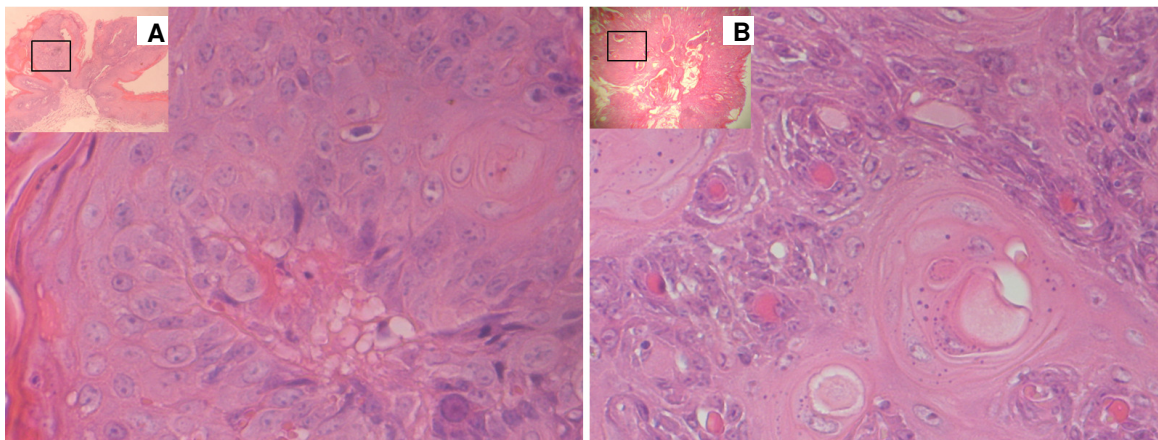


Figura 4 - Aspectos histológicos, em 20 semanas de: (4A) CCE bem diferenciado, grupo EEP, crescimento exofítico (HE, 40x e 200x); (4B) CCE moderadamente diferenciado, grupo EAP, crescimento endofítico, com envolvimento de quase toda a língua (HE, 40x e 400x)

Tabela 4 - Distribuição dos aspectos histológicos dos CCE em mucosa lingual dos grupos EEP, EAP e DMBA, de 13 e 20 semanas

Aspecto histológicos dos CCE	Períodos experimentais							
	13 semanas				20 semanas			
	Grupo EEP	Grupo EAP	Grupo DMBA	Valor de p	Grupo EEP	Grupo EAP	Grupo DMBA	Valor de p
CCE ($n=21$) $n(\%)$	1(4,75)	0(0)	0(0)	0,355 ^a	8(38,05)	6(28,6)	6(28,6)	0,549 ^a
**CCEBD $n(\%)$	1(4,75) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0,355 ^a	8(38,05) ^a	5(23,81) ^a	5(23,8) ^a	0,342 ^a
*Valor ou média da A histológica e desvio padrão – CCEBD	3,97	-	-	-	1,47±0,66 ^b	5,11±5,23 ^b	1,63±0,92 ^b	0,364 ^b
Valor (mínimo-máximo)	-	-	-	-	(0,54-1,98)	(0,16-13,2)	(0,21-2,48)	-
**CCEMD $n(\%)$	0(0)	0(0)	0(0)	-	0(0) ^a	1(4,75) ^a	1(4,75) ^a	0,566 ^a
*Valor da A histológica - CCEMD	-	-	-	-	-	17,72 ^c	27,6 ^c	0,317 ^c
**CCEI $n(\%)$	0(0)	0(0)	0(0)	-	0(0)	0(0)	0(0)	-
Tipo de crescimento no front de invasão:								
Exofítico $n(\%)$	1(4,75) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0,355 ^a	8(38,05) ^a	5(23,8) ^a	3(14,3) ^a	0,114 ^a
Endofítico $n(\%)$	0(0)	0(0)	0(0)	-	0(0) ^a	1(4,75) ^a	3(14,3) ^a	0,100 ^a

A=área em mm², CCE=carcinoma de células escamosas, CCEBD= carcinoma de células escamosas bem diferenciado, CCEMD= carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, CCEI=carcinoma de células escamosas indiferenciado. * Valor ou média da área histológica do CCE. ** Ocorrência dos CCE (carcinomas de células escamosas) de acordo com a graduação histológica de malignidade proposta por Johnson *et al.*[26].

^aTeste qui-quadrado

^bTeste de *Kruskal-Wallis*

^cTeste de *Mann-Whitney*

mento exofítico e graduação de malignidade bem diferenciados. Além disso, a maior média da área histológica dos CCE foi para o grupo EAP. Para cada um dos grupos, EAP e DMBA, ocorreu um caso de CCE, com crescimento endofítico, envolvendo

quase toda a língua e a graduação de malignidade de ambos foi moderadamente diferenciado (Figura 4 e Tabela 4).

3.5 Discussão

A célula cancerosa surge de uma transformação genômica de um eucarioto, devido à mutação de alguns genes que modificam o fenótipo normal para canceroso. As mutações podem ocorrer pela ação do DMBA (GEYER et al., 1953; DARCHUN; HADLER, 1956; GIRI et al., 1996; CAVALCANTE et al., 2011) e de outros agentes carcinógenos. Como na iniciação da carcinogênese induzida por DMBA há produção de radicais livres, subprodutos de sua metabolização que desencadeiam as mutações no DNA (GIRI et al., 1996; BHATTACHARYYA et al., 2010), o DMBA foi empregado na presente pesquisa.

As aplicações tópicas de DMBA 0,5 % em acetona induzem lesões cancerosas em mucosa lingual, com ou sem escarificação prévia (FUJITA et al., 1973; EVESON; MACDONALD, 1981). Na presente pesquisa, o DMBA e as substâncias-teste foram aplicadas topicamente, com ausência de escarificação prévia e de sedação dos animais, por ser um modelo de carcinogênese lingual validado (LIMA; TAVEIRA, 1999; CARDOSO et al., 2005) e que promove menor estresse nos animais.

Os extratos de própolis ou seus compostos químicos isolados que tiveram seus efeitos quimiopreventivos comprovados em pesquisas (KIMOTO et al., 2001; ORSOLÍĆ et al., 2005; YASUI et al., 2008; CAVALCANTE et al., 2011), não estão disponíveis à população. Extratos de própolis que se encontram disponíveis comercialmente para a venda em drogarias (BRASIL; 2001), ainda não foram

testados em modelo de carcinogênese induzida, e a escolha da marca comercial de extrato de própolis que foi utilizada se deveu ao fato de nossa equipe de pesquisa já ter utilizado estes extratos em um estudo anterior no qual foi testado seus efeitos antiinflamatórios (BARROSO et al., 2011). Além disso, pessoas do grupo de risco para lesões cancerosas, como as que têm hábito de fumar e/ou de consumir bebidas alcoólicas, podem se automedicar utilizando diariamente EEP devido à halitose ou alguma sintomatologia em cavidade bucal ou orofaringe. Como as estruturas bucais se encontram em contato direto com EEP, que contém álcool em sua composição, é conveniente avaliar a reação tecidual da mucosa lingual submetida ao estresse oxidativo e ao tratamento com EEP.

Como as alterações genômicas podem variar de *hamster* para *hamster*, entre os tipos de tecidos de um mesmo *hamster*, na presente pesquisa, as aplicações alternadas de DMBA, EEP e EAP foram constantes ao longo dos dois períodos experimentais. Estes períodos de 13 e 20 semanas, estão de acordo com outros estudos (LIMA; TAVEIRA, 1999; CARDOSO et al., 2005), sendo que por meio da análise das alterações clínicas e histológicas, há possibilidade de avaliar, em 13 semanas, os efeitos iniciadores ou quimiopreventivos, e em 20 semanas, os efeitos do potencial de quimioprevenção, promoção ou progressão do câncer das substâncias-teste.

O potencial quimiopreventivo de extratos de própolis tem sido verificado em diferentes sítios anatômicos (KIMOTO et al., 2001; BAZO et al., 2002; ORSOLÍĆ et al., 2005; YASUI et al., 2008). Na presente pesquisa, a mucosa lingual foi o sítio de escolha para a aplicação das substâncias por haver aumento da incidência de câncer de língua em humanos (REDDY et al., 2010) e poucos estudos de carcinogênese em língua de *hamsters* (CAVALCANTE et al., 2011).

O peso médio dos *hamsters* desta pesquisa aumentou ao longo do experimento, significando que a indução de câncer na língua não prejudicou a dieta dos animais. Entretanto, houve um declínio do peso médio no grupo DMBA em relação aos outros grupos, a partir da 15ª semana. Esta observação está de acordo com Lajolo e colaboradores (2008), ao relacionarem a perda de peso à toxicidade do DMBA; e com Li e colaboradores (1999), ao surgimento de lesões extensas em cavidade bucal. Isto pode explicar a antecipação da eutanásia, por questões bioéticas, de um animal do grupo DMBA que apresentava caquexia, relacionada a uma extensa lesão na língua, realizada antes da finalização do experimento.

De todos os animais do período de 13 semanas, a única lesão exofítica, que ocorreu no grupo EEP, foi um caso de CCE. Tal fato não ocorreu no grupo DMBA, indicando um menor período de latência da carcinogênese no grupo EEP, que poderia ser atribuído ao solvente. Como o álcool etílico é considerado uma substância cocarcinógena por provocar aumento da permeabilidade tecidual e por induzir a oxidação por meio de acetaldeído (FIGUERO-RUIZ et al., 2004; MARTINEZ et al., 2005; SEITZ; STICKEL, 2009; REIDY et al., 2011), o teor alcoólico deste solvente, presente no EEP utilizado na presente pesquisa, pode ter aumentado a absorção do DMBA e potencializado sua ação carcinogênica. Isso está de acordo com os resultados encontrados por Bazo e colaboradores (2002), que, ao tratarem câncer de cólon em ratos, induzido por meio de 1,2 dimetilhidrazina, observaram maior ocorrência de focos aberrantes de criptas intestinais no grupo tratado com álcool etílico a 32 %.

A igualdade de ocorrência de hiperplasia e hiperqueratose com ausência de atipias, no período de 13 semanas, entre os grupos EEP e DMBA; e menor no grupo EAP, sugere que os componentes da própolis contidos no EAP não protegeram a

mucosa lingual das reações teciduais desencadeadas pela carcinogênese, pois, neste mesmo tempo, houve maior ocorrência de DEE discreta para o grupo EAP, entre grupos. O menor teor total de polifenóis e de flavonoides presente no extrato seco do EAP testado nesta pesquisa pode ser um dos fatores que sugere a ausência de quimioprevenção observada no grupo tratado com ele. Entretanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar os aspectos moleculares das reações teciduais.

A maior média da área histológica dos CCE encontrados no grupo EAP sugere associação com a menor concentração de compostos fenólicos, fato que pode ter contribuído para a obtenção deste resultado. Enquanto que, a maior ocorrência de CCE no grupo EEP, sugere uma reação tecidual de promoção da carcinogênese. Os resultados da presente pesquisa discordam dos encontrados por Cavalcante e colaboradores (2011), que induziram câncer em língua de hamstes, por meio de aplicação tópica de DMBA a 0,5 % em acetona, submetido ao tratamento com extratos etanólicos de própolis verde brasileira (EEPV) e verificaram uma redução do número de AE, AC e do grau de malignidade das lesões no grupo tratado com EEPV. As diferenças entre estes resultados e os da presente pesquisa podem ser explicadas pelo fato de Cavalcante e colaboradores (2011) terem utilizado um EEPV com maior teor de extrato seco e administrado o EEPV pela via oral, empregando o método gavagem, sem que a mucosa bucal tivesse contato com o solvente etanólico.

3.6 Conclusão

De acordo com os resultados encontrados, pode-se sugerir que o EAP não interferiu na reação tecidual da carcinogênese induzida por DMBA em língua de *hamsters* e que o álcool etílico, solvente do EEP, pode ter diminuído o período de latência da carcinogênese e favorecido a promoção da carcinogênese por mecanismos não elucidados. São necessários mais estudos para testar extratos de própolis de outras marcas comerciais, com diferentes concentrações de extrato seco e de teor alcoólico em estudos *in vitro* e *in vivo*.

3.7 Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Alexandre Soares dos Santos, do Laboratório de Bioquímica, pela análise química dos extratos de própolis e ao Sr. Leonardo da Cunha Monteiro, do Laboratório de Patologia pelo suporte técnico, ambos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer é uma das doenças que apresenta altos índices de morbidade e mortalidade, acometendo vários órgãos. Devido a isso, há necessidade da descoberta de novas substâncias com efeitos quimiopreventivos na carcinogênese. Entretanto, há poucos estudos *in vivo* de carcinogênese induzida associada ao tratamento com própolis. Como a própolis ou seus compostos químicos isolados apresentam ações quimiopreventivas comprovadas em diversos estudos *in vitro*, atualmente há necessidade da realização mais de estudo *in vivo*, que visem testar a própolis ou seus compostos isolados.

De acordo com os resultados encontrados no artigo de pesquisa, o EEP a 30 % pode ter favorecido a reação tecidual da iniciação e da promoção da carcinogênese induzida por DMBA. Entretanto, são necessários mais estudos para testar extratos de própolis de outras marcas comerciais, com diferentes concentrações de extrato seco e de teor alcoólico.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. [No authors listed] Chemical Carcinogenesis. **British medical journal**, London, v. 2, n. 4529, p. 659-660, Oct.1947.
2. BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, Aug. 2005.
3. BANSKOTA, A.H. et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 80, n. 1, p. 67-73, Apr. 2002.
4. BARROSO, P.R. et al. Effect of própolis on mast cells in wound healing. **Inflammopharmacology**, Basel, Dec. 2011.
5. BAZO, A.P. et al. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, New York, v. 22 n. 3, p. 183-194, 2002.
6. BERENBLUM, I.; SHUBIK, P. The persistence of latent tumour cells induced in the mouse's skin by a single application of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene. **British journal of cancer**, London, v. 3 n. 3, p. 384-386, Sept. 1949.
7. BHATTACHARYYA, S.S. et al. Anti-oncogenic potentials of a plant coumarin (7-hydroxy-6-methoxy coumarin) against 7,12-dimethylbenz [a] anthracene-induced skin papilloma in mice: the possible role of several key signal proteins. **Journal of Chinese integrative medicine**, Shanghai, v. 8, n. 7, p. 645-654, July 2010.
8. BORRELLI F et al. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, Suppl. 1, p. 38-43, Nov. 2002.

9. Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 174-147, Aug. 2000.
10. BOYLAND. E. Chemical carcinogenesis and experimental chemotherapy of cancer. **The Yale journal of biology and medicine**, New Haven, v. 20 n. 4, p. 321-341, Mar. 1948.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3**, de 19 de janeiro de 2001. Publicado no DOU de 23/01/2001, Seção 1, p.18, 2001.
12. CAMPBELL, J.M.; LINDSEY, A.J. Polycyclic hydrocarbons extracted from tobacco: the effect upon total quantities found in smoking. **British journal of cancer**, London, v. 10, n. 4, p. 649-652, Dec. 1956.
13. CARDOSO, C.L.; PRADO, R.F.; TAVEIRA, L.A. Macroscopic and microscopic study of tissue response to oral antiseptics and its influence on carcinogenesis. **Journal of applied oral science**, Bauru, v. 13, n. 3, p. 286-290, July-Sept. 2005.
14. CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v. 73 n. 1 suppl., p. s1-s6, Nov. 2002.
15. CAVALCANTE, D.R. et al. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 278-284, June 2011.
16. CHIRUMBOLO, S. Propolis as anti-inflammatory and anti-allergic compounds: which role for flavonoids? **International immunopharmacology**, Amsterdam, v. 11, n. 9, p. 1386-1387, Sept. 2011.

17. CUNHA, I.B.S. et al. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.
18. DARCHUN, V.; HADLER, H.I. Metabolic and carcinogenic studies with 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. **Cancer research**, Baltimore, v. 16, n. 4, p. 316-323, May 1956.
19. DEMESTRE, M. et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. **Phytotherapy research**, Chichester, v. 23, n. 2, p. 226-230, Feb. 2009.
20. DUAILIBE, S.A.; GONÇALVES, A.G.; AHID, F.J. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of applied oral science**, Bauru, v. 15, n. 5, p. 420-423, Oct. 2007.
21. EISENBERG, E. Neoplasia following cessation of DMBA application to hamster buccal pouch. **Jornal of dental research**, Chicago, v. 56, n. 11, p. 1430, Nov. 1977.
22. ELZAY, R.P. Local effect of alcohol in combination with DMBA on hamster cheek pouch. **Journal of dental research**, Chicago, v. 45, n. 6, p. 1788-1795, Nov-Dec. 1966.
23. ENGELBRETH-HOLM, J.; IVERSEN, S. On the mechanism of experimental carcinogenesis. II. The effect of different concentrations of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene on skin-carcinogenesis in mice. **Acta pathologica et microbiológica Scandinavica**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 77-83, 1951.

24. EVESON, J.W.; MACDONALD, D.G. Hamster tongue carcinogenesis. I. Characteristics of the experimental model. **Journal of oral pathology**, Chicago, v. 10, n. 5, p. 322-331, Oct. 1981.
25. FAN, Y. et al. Epimedium polysaccharide and propolis flavone can synergistically inhibit the cellular infectivity of NDV and improve the curative effect of ND in chicken. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 439-444, Apr. 2011.
26. FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 5, p. 563-566, Aug. 2005.
27. FERREIRA, A.B.H.; ANJOS, M.; FERREIRA, M.B. **Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa**. 5. ed. Curitiba: Positivo, 2010. 2220 p.
28. FIGUERO-RUIZ, E. et al. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. **Medicina oral**, Madrid, v. 9, n. 1, p. 14-23, Jan-Feb. 2004.
29. FRENKEL, K.; WEI, L.; WEI, H. 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induces oxidative DNA modification *in vivo*. **Free radical biology & medicine**, Tarrytown, v. 19, n. 3, p. 373-380, Sept. 1995.
30. FUJITA, K. et al. Experimental production of lingual carcinomas in *hamsters*: tumor characteristics and site of formation. **Journal of dental research**, Chicago, v. 52, n. 6, p. 1176-1185, Nov-Dec. 1973.
31. GALE, N, et al. Epithelial precursor lesions In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D editors. **WHO classification head and neck tumours**. Lyon: IARC Press; p. 177-179, 2005.

32. GEYER, R.P. et al. Tumor production in rats injected intravenously with oil emulsions containing 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. **Cancer research**, Baltimore, v. 11, n. 6, p. 474-478, June 1951.
33. GEYER, RP. et al. Effect of dose and hormones on tumor production in rats given emulsified 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene intravenously. **Cancer research**, Baltimore, v. 13, n. 7:1, p. 503-506, July 1953.
34. GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review, **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.
35. GIRI, U.; IQBAL, M.; ATHAR, M. Porphyrin-mediated photosensitization has a weak tumor promoting activity in mouse skin: possible role of in situ-generated reactive oxygen species. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 2023-2028, Sept. 1996.
36. HUANG, M.T. et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 761-765, Apr. 1996.
37. INOUE, K. et al. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line *in vivo* and *in vitro*. **The American Journal of Chinese medicine**, Singapore, v. 36, n. 3, p. 625-634, 2008.
38. ISHIHARA, M. et al. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology reports**, Athens, v. 22, n 2, p. 349-354, Aug. 2009.
39. ISLA, M.I. et al. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v. 12, n. 6, p. 1334-1342, Dec. 2009.

40. IVANOVSKA, N.D. et al. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo*. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 47, n. 3, p. 145-147, July 1995.
41. JOHNSON, N. et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D editors. **WHO classification head and neck tumours**. Lyon: IARC Press; 2005. p.168-175, 2005.
42. KATZ, H.C.; SHEAR, M.; ALTINI, M. A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. **Journal of oral pathology**, Copenhagen, v. 14, n. 6, p. 476-482, July 1985.
43. KAWABE, M. et al. Modifying effects of propolis on MeIQx promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two-stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. **Nutrition and cancer**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 179-186, 2000.
44. KHALIL, M.L. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, Bangkok, v. 7, n. 1, p. 22-31, Jan-Mar. 2006.
45. KIMOTO, N. et al Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. **Cancer letters**, Limerick, v. 147, n. 1-2, p. 221-227, Dec. 1999.
46. KIMOTO, T. et al. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. **Pathology international**, Carlton South, v. 50, n. 9, p. 679-689, Sept. 2000.
47. KIMOTO, T. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, Berlin, v. 438, n. 3, p. 259-270, Mar. 2001.

48. LAJOLO, C. et al. N-(4-hydroxyphenyl)all-trans-retinamide (4-HPR) high dose effect on DMBA-induced hamster oral cancer: a histomorphometric evaluation. **International journal of oral maxillofacial surgery**, Copenhagen, v. 37, n. 12, p. 1133-1140, Dec. 2008.
49. LETCHOUMY, P.V. et al. Comparative evaluation of antiproliferative, antiangiogenic and apoptosis inducing potential of black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. **Journal of Carcinogenesis**, Mumbai, v. 6, n. 19, Dec. 2007.
50. LI, F. et al. Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines. **Natural product communications**, Westerville, v. 5, n. 10, p. 1601-1606, Oct. 2010.
51. LI F. et al. Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 72, n. 7, p. 1283-1287, July 2009.
52. LI, N.; HAN, C.; CHEN, J. Tea preparations protect against DMBA-induced oral carcinogenesis in *hamsters*. **Nutrition and cancer**, Philadelphia, v. 35, n. 1, p. 73-79, 1999.
53. LIMA, N.L.; TAVEIRA, L.A.A. Study of morphologic changes caused by concomitant induction of DMBA and heavy alcoholic drinks in oral chemical carcinogenesis. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Bauru, v. 7, n. 1-2, p. 61-66, 1999.
54. MAREFAT, P.; SHKLAR, G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, St. Louis, v. 44, n. 4, p. 578-586, Oct. 1977.

55. MARTINEZ, M. et al. Ultrastructural changes on the hard palatine mucosa of *Calomys callosus* after 120 days of experimental chronic alcoholism. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, Siena, v. 37, v. 1, p. 59-65, Apr. 2005.
56. MEIER, J.D. et al. Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. **Archives of otolaryngology - head & neck surgery**, Chicago, v. 133 n. 11, p. 1149-1152, Nov. 2007.
57. MESSERLI, S.M. et al. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. **Phytotherapy research**, Chichester, v. 23 n. 3, p. 423-427, Mar. 2009.
58. MITAMURA, T. et al. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. **Anticancer research**, Athens, v. 16, n. 5A, p. 2669-2672, Sept-Oct. 1996.
59. MONSUEZ JJ. et al. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **International journal of cardiology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 3-15, Sept. 2010.
60. MORRIS, A.L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. **Journal of dental research**, Chicago, v. 40, p. 3-15, Jan-Feb. 1961.
61. NAGINI, S. Of humans and *hamsters*: the hamster buccal pouch carcinogenesis model as a paradigm for oral oncogenesis and chemoprevention. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 843-852, oct. 2009.
62. NAJAFI, M.F. et al. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. **Cytotechnology**, Boston, v. 54, n. 1, p. 49-56, May 2007.

63. NUNES, C.A.; GUERREIRO, M.C. Characterization of Brazilian green propolis through out the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the science of food and agriculture**, London, v. 92, n. 2, n. 433-438, jan. 2012.
64. ORSOLIĆ, N. et al. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible mode of antitumor action. **Nutrition and cancer**, Philadelphia, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2003.
65. ORSOLIĆ, N. et al. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 10, p. 1928-1933, Oct. 2005.
66. OTTENEDER, M.; LUTZ, W.K. Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. **Mutation research**, Amsterdam, v. 424, n. 1-2, p. 237-247, Mar.1999.
67. PADMAVATHI, R. et al. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female *Sprague Dawley* rats. **Life sciences**, Oxford, v. 78, n. 24, p. 2820-2825, May 2006a.
68. PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology**, New York, v. 143, n. 3, p. 349-354, July 2006b.
69. PARK, Y.K. et al. Survey of some components of propolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Brazilian archives of biology and tecnologia**, Curitiba, v. 38, p. 1253-1259, 1995.

70. PAULINO, N. et al. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. **Journal of pharmacological sciences**, Kyoto, v. 93, n. 3, p. 307-313, Nov. 2003.
71. PRATSINIS, H. et al. Antiproliferative activity of Greek propolis. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v. 13, n. 2, p. 286-290, Apr. 2010.
72. QUINTERO-MORA, M.L. et al. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* *in vitro* growth. **Revista iberoamericana de micología**, Madrid, v. 25, n. 1, p. 22-26, Mar. 2008.
73. REDDY, V.M.; CUNDALL-CURRY, D.; BRIDGER, M.W. Trends in the incidence rates of tonsil and base of tongue cancer in England, 1985-2006. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, London, v. 92, n. 8, p. 655-659, Nov. 2010.
74. REIDY, J.; MCHUGH, E.; STASSEN, L.F. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. **The surgeon**, Edinburgh, v. 9, n. 5, p. 278-283, Oct. 2011.
75. RUBIN, H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 1903-1930, Dec. 2001.
76. SAID, R.A. et al. Absence of chemopreventive influence of propolis on the rat liver altered foci development. **Experimental and toxicologic pathology**, New York, v. 62, n. 4, p. 405-412, July. 2010.
77. SCHULTE-HERMANN, R. et al. Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis. **Cell biology and toxicology**, Princeton, v. 13, n. 4-5, p. 339-348, July 1997.

78. SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B.; BURSCH, W. Tumor development and apoptosis. **International archives of allergy and immunology**, New York, v. 105, n. 4, p. 363-367, Dec. 1994.
79. SEITZ, H.K.; STICKEL, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. **Genes & nutrition**, New Orleans, v. 5, p. 121-128, Oct. 2009.
80. SILVA, B.B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 313-316, Sept. 2008.
81. SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, [S.L.], v. 299, p. 152-178, 1999.
82. SURESH, K. et al. Chemopreventive and antioxidant efficacy of (6)-paradol in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Pharmacological reports**, Kraków, v. 62, n. 6, p. 1178-1185, Nov-Dec. 2010.
83. TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry central journal**, London, v. 1, n. 13, June 2007.
84. WANG, T. et al. Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, Ottawa, v. 86, n. 5, p. 279-287, May 2008.
85. WENG, M.S.; HO, Y.S.; LIN, J.K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38

- mitogen-activated protein kinase. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 69 n.12, p. 1815-1827, June 2005.
86. XU, Y.Z. et al. Role of the Chinese herbal medicine xianhuayin on the reversal of premalignant mucosal lesions in the golden hamster buccal pouch. **International journal of oral science**, Chengdu, v. 2, n 1, p. 53-58, Mar. 2010.
87. YASUI, Y. et al. Aqueous and ethanolic extract fractions from the Brazilian propolis suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. **Oncology reports**, Athens, v.20, n. 3, p. 493-499, Sept. 2008.



UFVJM

ANEXO

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS / UFVJM



Diamantina, 30 de março de 2011.
Diamantina, March 30, 2011.

O Projeto de: Pesquisa

Protocolado sob n°: 004/2010
Intitulado: EFEITO DA PRÓPOLIS EM MUCOSA BUCAL: MODELO DE CARCINOGENESE DMBA INDUZIDA.
Pesquisador (a) responsável: Profª Drª Flaviana Dornela Verli
Universidade/Faculdade/Departamento UFVJM / FCBS / DCB

Foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM em 30 de março de 2011.

In English

Filed under number: 004/2010
Title: EFFECT OF THE PROPOLIS IN THE ORAL MUCOSA: CARCINOGENESIS MODEL OF DMBA-INDUCED.
Responsible Researcher: Dr. Flaviana Dornela Verli
University/College/Department UFVJM / FCBS / DCB

This research was **approved** by the Ethics Committee on Animal Use of UFVJM on March 30, 2011.

Cristiane Tolentino Machado
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM

Campus JK
Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM
Prédio da Reitoria sala 35 - Rodovia MG1 367
Km 583, nº 5000 Alto da Jacuba - Diamantina/MG -
CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200

CEUA Comissão de Ética
no Uso de Animais



BIOGRAFIA

Ricardo Lopes Rocha

Nascimento	04 de maio de 1963, em Diamantina, Minas Gerais, Brasil
Filiação	Arnaldo Pinheiro Paulino Rocha (<i>in memmorian</i>) Corália Lopes Rocha
1981-1984	Graduação em Odontologia pela Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina (FAFEOD)
Abril 1987	Aprovado em concurso público para professor auxiliar para a disciplina: Escultura Dental (FAFEOD)
Jan-dez 2000	Especialização em Saúde Pública para a Educação pela FAFEOD
2012	Mestre em Odontologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGOdonto), área de concentração em Clínica Odontológica pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

Publicações

The screenshot shows the PubMed.gov search interface. The search term 'Lopes Rocha R' is entered in the search box. The results are displayed in a list format, sorted by 'Recently Added'. Two results are shown:

Display Settings: Summary, Sorted by Recently Added

Results: 2

[Nasolabial cyst: 18.5 year experience in a pathology laboratory.](#)
 1. **Lopes-Rocha R**, Dornela Verli F, Lages Lima N, Rocha Dos Santos CR, Aparecida Marinho S. *Minerva Stomatol.* 2011 Nov;60(11):567-72.
 PMID: 22210460 [PubMed - in process]
[Related citations](#)

[Effect of propolis on mast cells in wound healing.](#)
 2. Barroso PR, **Lopes-Rocha R**, Pereira EM, Marinho SA, de Miranda JL, Lima NL, Verli FD. *Inflammopharmacology.* 2011 Dec 17. [Epub ahead of print]
 PMID: 22179947 [PubMed - as supplied by publisher]
[Related citations](#)



Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Campus JK - Rodovia MGT 367 - Km 583, 5000
Alto da Jacuba, Bloco II - Sala 02
CEP: 39100-000, Diamantina, MG, Brasil
Fone: +55 (38) 3532 1242 /1283 /1284
<http://www.ufvjm.edu.br>

Programa de Pós-Graduação em Odontologia - PPGOdonto
Campus I - Rua da Glória, 187 - Prédio da Biblioteca, sala 12
CEP: 39100-000, Diamantina, MG, Brasil
Fone: +55 (38) 3532 6099
<http://www.ufvjm.edu.br/site/ppgodonto/>