

Avaliação do efeito anticarcinogênico da própolis verde (Artepelin C) por meio do teste *warts* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Evaluation of anticarcinogenic effect of Green propolis by warts test in somatic cells of Drosophila melanogaster



Mariana Rodrigues da Silva

Graduanda do curso de Fisioterapia (UNIPAM). e-mail: marianarodrigues1406@gmail.com

Rosiane Gomes Silva Oliveira

Professora do Centro Universitário de Patos de Minas. e-mail: rosianegso@unipam.edu.br

Mirley Alves Vasconcelos

Professora do Centro Universitário de Patos de Minas. e-mail: mirleyav@unipam.edu.br

RESUMO: A própolis verde é proveniente de substâncias extraídas da *Baccharis dracunculifolia*, planta nativa do Brasil, que fornece alto teor de flavonoides e Artepelin C. Apresenta diversas propriedades farmacológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, entre outras. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito anticarcinogênico da própolis verde por meio do teste *warts* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Para tanto, larvas de terceiro ínstar foram tratadas com três concentrações (137,5, 275 e 550 µg/mL) do extrato da própolis verde, isoladamente ou associadas ao quimioterápico DXR (0,4 mM). Os resultados revelaram que nas concentrações isoladas não houve aumento nas frequências de tumores, porém, nas concentrações associadas houve redução na frequência de tumores. Conclui-se que a própolis verde não apresentou efeito carcinogênico nas concentrações testadas isoladamente, mas tem efeito anticarcinogênico, pois foi capaz de inibir os danos induzidos pela DXR.

PALAVRAS-CHAVE: *D. melanogaster*. Própolis Verde. *Wts*.

ABSTRACT: Green propolis comes from substances extracted from *Baccharis dracunculifolia*, a native Brazilian plant, which provides high levels of flavonoids and Artepillin C. It has several pharmacological properties, such as antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, immunomodulatory, among others. Thus, the aim of this study was to evaluate the anticarcinogenic effect of green propolis, by using warts test in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. For this, third instar larvae were treated with three concentrations (137.5, 275 and 550 µg / mL) of the green propolis extract alone or associated with the DXR chemotherapeutic agent (0.4 mM). The results showed that in the isolated concentrations there was no increase on tumors

frequencies, however when they were associated there was a reduction on tumors frequency. It is possible to conclude that green propolis did not present a carcinogenic effect at the concentrations tested, but it has anticarcinogenic effect, since it was able to inhibit the damage induced by DXR.

KEYWORDS: *D. melanogaster*. Green Propolis. *Wts*.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o homem descobriu vários benefícios dos produtos naturais na medicina. Das diversas formas de utilização destacam-se as plantas brutas, como as ervas, além das tradicionais preparações galênicas, como os extratos. Um dos inúmeros produtos naturais utilizados durante séculos pela espécie humana tem sido a própolis, que pode ser administrada sob diversas formas (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002). O Brasil é um país que apresenta vasto litoral, com grande diversidade de flora e é o detentor da maior floresta tropical pluvial do planeta, não podendo, assim, abdicar de sua propensão para os produtos naturais (PINTO *et al.*, 2001).

A própolis se constitui de várias substâncias e apresenta uma consistência viscosa. Esta substância é recolhida pelas abelhas nos brotos, cascas de árvores ou de quaisquer outras partes do tecido vegetal, e transportada até a colmeia. Lá as abelhas, geralmente da espécie *Apis mellifera*, modificam sua composição, adicionando secreções próprias como cera e saliva (PINTO *et al.*, 2001). A principal função da própolis é proteger a colmeia dos microrganismos e insetos, reparar frestas ou danos à colmeia, preparar locais assépticos para postura da abelha rainha e também mumificar insetos invasores (MARCUCCI, 1996). Já para a ciência, a própolis apresenta diversas atribuições e tem sido objeto de vários estudos farmacológicos devido à sua propriedade antitumoral (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A própolis verde advém de uma planta nativa do Brasil, que fornece o mais alto teor de flavonoides e substâncias, como o Artepelin C (ART C) (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Segundo Filardi (2010), a própolis verde tem sido muito utilizada em pesquisas por apresentar propriedades farmacológicas efetivas no tratamento do câncer. Carrão (2015) também destaca as atividades anticancerígenas do ART C, capaz de torná-lo um fármaco para o tratamento de inúmeros tipos de câncer, como o de pulmão, rins, cólon, testículos, próstata e leucemia. Contudo, Lopes (2008) relata que produtos da farmacopeia popular brasileira, como própolis, casca de cajueiro e alecrim-do-campo, se administrados em doses altas, podem ocasionar mutações ameaçadoras no DNA.

Diversos estudos estão em andamento, mas ainda não há um consenso sobre os benefícios reais da Própolis verde (ART C) sobre as células tumorais. Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho é verificar o possível efeito anticarcinogênico da Própolis verde (ART C), por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*, em sistema de cotratamento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PRÓPOLIS VERDE (ARTEPELIN C)

O termo *própolis* remonta ao léxico grego e resulta da confluência de *pro-* (defesa) e *polis-* (cidade ou comunidade), o que significa “em defesa da cidade”, ou seja, da colmeia (MOREIRA; ROGÃO; ESTEVINHO, 2011). A própolis é uma resina coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas, como gemas vegetativas, botões florais e exsudados resinosos (NASCIMENTO *et al.*, 2009). A coloração da própolis está relacionada com sua procedência, que pode variar do marrom escuro, passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado e apresenta odor característico (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Sua composição química depende, portanto, da flora da região onde é produzida e da época do ano em que é coletada (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Deste modo, a própolis verde brasileira tem como principal fonte botânica a *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como vassourinha ou alecrim-do-campo, uma planta nativa do Brasil, que fornece o mais alto teor de flavonoides e substâncias como aldeídos aromáticos, cumarinas, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, ácidos e ésteres alifáticos, entre outros, sendo o ART C um de seus principais componentes (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta própolis apresenta diversas atribuições e tem sido objeto de vários estudos farmacológicos devido à sua propriedade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, entre outras. Esse potencial biológico acontece devido ao sinergismo entre os muitos constituintes (LUSTOSA *et al.*, 2008), e dessa forma, tem adquirido cada vez mais destaque no mercado internacional (SZLISZKA *et al.*, 2013).

2.2. CÂNCER E DOXORRUBICINA (DXR)

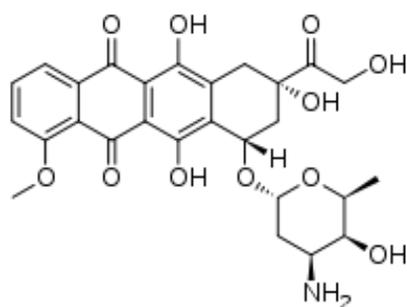
O câncer é um nome dado a um grupo de mais de 100 patologias que têm em comum a multiplicação e disseminação de células, podendo ser classificadas como malignas ou benignas, dependendo de sua agressividade. Quando o câncer for maligno, as células cancerosas ainda podem sofrer um processo conhecido como metástase, em que estas células invadem diferentes tecidos do organismo (INCA, 1996). A formação do tumor é conhecida como carcinogênese e ocorre devido à mutação no material genético das células (DNA), capaz de ativar os genes chamados proto-oncogenes e/ou inativar os genes responsáveis por suprimir tumor (DANTAS, *et al.*, 2009). Assim, o ciclo celular se torna alterado e ocorre o aumento da proliferação e déficits nas mortes celulares, ocasionando o agrupamento de células neoplásicas, gerando tumores (FERRARI; TORRES, 2002, RESENDE, 2007).

Atualmente, um dos medicamentos antineoplásicos mais utilizados na terapêutica é a doxorrubicina (DXR) (Figura 1), apresentando capacidade significativa sobre tumores, incluindo alguns que são geralmente refratários a outros fármacos. Este fármaco é da classe das antraciclinas e é obtido a partir da fermentação do fungo *Streptomyces peucetius var. caesi* (SILVA; CAMACHO, 2005).

A DXR é ativa durante todo o ciclo celular, causando efeitos antiproliferativos nos

tecidos tumorais e também em outros tecidos. Este composto apresenta vários mecanismos de ação como: (i) intercalação do DNA; (ii) inibição da síntese de proteínas e das enzimas topoisomerase; e (iii) desenvolvimento de radicais livres (LORI; STEIN; THAMM, 2010; CANDIDO, 2013). Por outro lado, a DXR tem a capacidade de interferir na integridade do material genético, identificada por seu potencial genotóxico, capaz de gerar lesões celulares irreparáveis, sob a forma de neoplasias (SILVA; CAMACHO, 2005).

FIGURA 1. Doxorubicina (DXR): Estrutura química



Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Doxorubicin_chemical_structure.png.
Acesso em: 02 de janeiro de 2017

Dessa forma, a DXR é utilizada no teste de detecção de clones de tumor epitelial (*warts*) em *Drosophila melanogaster*, como controle positivo, por ser capaz de induzir drasticamente o surgimento de tumores em células epiteliais em diversas áreas de sua estrutura corporal.

2.3. *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A *Drosophila melanogaster* é comumente nomeada como a “mosca da fruta”, pertence à ordem díptera, eucarionte e apresenta um par de cromossomo sexual e 8 pares de cromossomos autossômicos. Normalmente, apresenta dimensões reduzidas (3 a 4mm), cabeça arredondada, grandes olhos vermelhos e antenas curtas. A fêmea é maior que o macho, apresenta pentes sexuais e há menor quantidade de pigmentação negra na região posterior do abdome (MILLER, 2000; GOMES, 2001).

Esta mosca constitui um importante organismo modelo em estudos de Genética, por ser de fácil conservação em laboratório (temperatura ambiente de 18 a 25° C); (ii) alimentação e manuseamento; (iii) ciclo de vida curto dividido nos seguintes estágios: ovo, larva, pupa e adulto; (iv) descendência em número elevado; (v) fácil distinção dos sexos; e (vi) grande variedade de caracteres (PEREIRA et al, 2008).

A utilização da *Drosophila melanogaster* favorece as pesquisas referentes a patologias que envolvem seres humanos, devido à homologia existente entre seus genomas. O genoma da *Drosophila melanogaster* foi sequenciado em 2000, e pressupõe-se que este tenha 14.000 genes e 165 milhões de bases, enquanto o genoma humano apresenta cerca

de 22.500 genes e 3.400 milhões de bases. Além disso, patologias como câncer contam com aproximadamente 70% dos genes homólogos em *Drosophila melanogaster*, permitindo seu estudo (MANNING, 2008; MORALES; 2008, SEPEL; LORETO, 2010).

Em células normais os genes referentes ao ciclo celular controlam a proliferação das células, como é o caso dos genes supressores de tumor, que têm a função de inibir a mitose (BRASILEIRO FILHO, 2013). Já nas *Drosophila melanogasters*, os genes que atuam como supressores de tumor são os *WTS* (*warts*), que estão localizados no cromossomo 3R100A5. Em mamíferos, o LATS1 é homólogo a este gene e localiza-se no cromossomo 6q24-25 (EEKEN, 2002; XIA *et al.*, 2002). Se houver a exclusão deste gene, os discos imaginais das células epiteliais das larvas sofrerão uma hipertrofia apical, gerando as verrugas ou tumores na mosca adulta. Dessa forma, se existirem fatores que induzem o surgimento de tumores nestas células, pode-se associar ao risco de induzirem neoplasias em seres humano (JUSTICE *et al.*, 1995).

A fim de avaliar os efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos de diferentes substâncias utilizando a *Drosophila melanogaster*, pode-se utilizar o teste para detecção de tumor epitelial. Este também é chamado de *warts* ou *wts*, possuindo o alelo *warts* (*wts*) no cromossomo 3 (*wts*, 3-100) letal em homozigose. Assim, é fundamental que haja um cromossomo balanceador *TM3*. Para obtenção das larvas heterozigotas (*wts/+*), é necessário o cruzamento entre linhagens *wts/TM3* e *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*) (SIDOROV *et al.*, 2001).

3. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo experimental utilizando o fitoterápico extrato de própolis verde fabricado pela empresa Apis Flora, Lote: 004901316, adquirido comercialmente na cidade de Patos de Minas-MG. O extrato foi diluído em etanol 5% para preparação de três concentrações (137,5, 275 e 550 µg /mL). Estas concentrações foram calculadas com base no estudo de Szliszka *et al.* (2011), que testaram o extrato de própolis verde em células de câncer de próstata (LNCaP).

O cloridrato de doxorrubicina (DXR) é um fármaco comumente comercializado como Adriblastina® RD, CAS 25316-40-9. Para este experimento, a DXR foi utilizada como controle positivo devido a suas capacidades antineoplásicas. Sua forma molecular é C₂₇H₂₉NO₁₁, seu peso molecular é 580,0, e ela é vendida comercialmente como pó liofilizado em fracos contendo 10mg cada. Dessa forma, foram diluídas 0,03538g de Adriblastina (DXR) em 25 mL de água osmose reversa para se obter uma concentração de 0,4 mM.

Para realização do teste *wts* foram utilizadas duas linhagens mutantes: *wts/TM3* e *mwh/mwh*. A linhagem *wts/TM3* foi adquirida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, USA, com o número de registro: Bloomington/7052. Prontamente, o Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland) cedeu a linhagem *mwh/mwh*.

Essas referidas linhagens são estocadas e cultivadas no laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM, em recipientes de ¼ de litro abrangendo meio de cultura constituído por 1g de nipagin, 11 g de ágar, 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*),

156 g de banana e 820 mL de água e conservadas em uma incubadora B.O.D. 411 D, com temperatura em cerca de 25° C e umidade a 60% com fotoperíodo de 12 horas.

Para o desenvolvimento do presente estudo, procedeu-se ao cruzamento entre machos mwh/mwh com fêmeas wts/TM3. Realizado o cruzamento, os casais foram transferidos para recipientes com meio de cultura adequado para postura, contendo base sólida de ágar e uma camada de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com açúcar, próprio para as fêmeas depositarem seus ovos. A coleta dos ovos ocorreu no intervalo de 8h, e posteriormente os casais de *Drosophila* foram removidos, para desenvolvimento adequado dos ovos.

Após 72 horas decorrentes desse procedimento, as larvas de terceiro estágio foram retiradas, lavadas com água corrente e colocadas em frascos contendo 1,5 g de purê de batatas (meio alternativo para *D. melanogaster*). Em seguida, foram umedecidos com 5 mL das concentrações de própolis verde já preparadas, tanto isoladas quanto associadas a DXR (0,4 mM). Também foram preparados um controle positivo, utilizando a DXR a 0,4 mM, e um controle negativo, utilizando o etanol 5%. As larvas ficaram expostas aos agentes químicos até ocorrer empupação, durante 48 horas, aproximadamente.

Finalizado o período de metamorfose, as *D. melanogaster* adultas foram coletadas e acondicionadas em frascos com etanol (C₂H₆O) a 70%. As moscas podem apresentar fenótipo de pelo curto e grossos ou pelos longos e finos, porém, somente as de pelos longos e finos foram analisadas devido ao seu fenótipo selvagem (wts+/+ mwh) quanto à presença de tumor.

As análises foram realizadas utilizando-se a lupa estereoscópica, e a contagem de tumores ocorreu conforme descrito por Justice *et al.* (1995). Além da lupa, também foi utilizada uma placa escavada, onde foi depositada a glicerina (Glicerol C₃H₈O₃) com o objetivo de facilitar a movimentação da mosca e a própria análise. As moscas são colocadas nesta placa individualmente e analisadas com auxílio do pincel. A frequência de tumores observada foi expressa em um diagrama padrão, onde são quantificados os tumores de cada seguimento (olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres).

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores dos controles positivo e negativo e das concentrações testadas foram calculadas por meio do teste U, não paramétrico, de Mann Whitney, apresentando nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster* foi utilizado no atual estudo para avaliar a anticarcinogênicidade da própolis verde (ART C), cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratada com diferentes concentrações de própolis verde (Artepelin C) isoladas ou associadas a doxorubicina

Tratamentos			Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados						Total	Frequência (Nº de tumores/mosca)
Própolis Verde (concentração µg/mL)	DXR (mM)	EtOH		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter		
0	0	5%	150	0	8	7	26	7	1	49	0,33
0	0,4	0	150	50	237	638	542	778	104	2349	15,66*
137,5	0	0	150	1	10	5	32	20	0	68	0,45
275	0	0	150	0	14	5	35	9	1	64	0,43
550	0	0	150	0	18	9	18	10	0	55	0,37
137,5	0,4	0	150	0	26	17	27	18	1	89	0,60**
275	0,4	0	150	1	18	15	20	12	4	70	0,47**
550	0,4	0	150	0	24	23	23	27	1	98	0,65**

Diagnóstico estatístico, de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4 mM) ($p < 0,05$).

DXR, doxorubicina.

Os resultados demonstram que os indivíduos tratados apenas com etanol 5% (Tabela 1) obtiveram uma frequência de 0,33 tumores por mosca, importante para mostrar a frequência mínima de tumores, enquanto aqueles tratados somente com o controle positivo apresentou uma frequência de 15,66, comprovando a capacidade da DXR de induzir tumor. A atividade da DXR como controle positivo no teste de *wts* também foi confirmada nas pesquisas de Ribeiro e Machado (2016), Rocha, Alves e Orsolin (2015) e Cardoso e Nepomuceno (2015), em que os resultados obtidos também demonstraram aumentos significativos nas frequências de tumores em todos os segmentos corporais das *Drosophilas melanogaster*.

Ao avaliar a atividade carcinogênica dos indivíduos tratados com as concentrações isoladas da própolis verde (137,5, 275 e 550 µg/mL), comparadas ao controle negativo, verifica-se que não houve aumento estatisticamente significativo da frequência de tumores (Tabela 1). Dessa forma, foi evidenciado que a própolis verde não apresentou potencial carcinogênico nas concentrações testadas.

A ausência de efeito carcinogênico da própolis verde, mostrada nos resultados do presente estudo, corrobora os resultados da pesquisa realizada por Resende *et al.* (2007), que avaliaram o extrato etanólico de própolis verde em eritrócitos de ratos e observaram que o extrato não aumentou a frequência de micronúcleos, ou seja, não induziu mutagenicidade. Roberto, Morales e Malaspina (2009) também comprovam esses resultados por meio de seus estudos obtidos pelo sistema-teste de *Allium cepa*, em que este mesmo composto não induziu a mutagenicidade.

Além disso, a Tabela 1 também apresenta os resultados dos indivíduos que foram

tratados com própolis verde associada à DXR. Pode-se observar que, nestes indivíduos, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na frequência de tumores, quando comparada ao controle positivo. Logo, pressupõe-se que a própolis verde possui efeito modulador, capaz de reduzir os danos induzidos pela DXR. Assim, no presente estudo, a própolis verde apresentou efeito anticarcinogênico.

O principal componente da própolis verde é o ART C, que, de acordo com Szliszka *et al.* (2012), apresenta capacidade de induzir apoptose em células tumorais, de romper o potencial de membrana mitocondrial e, ainda, de sensibilizar o fator de necrose tumoral endógeno por meio da modulação da função do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Devido a esses efeitos, o ART C é considerado um importante quimiopreventivo. Compostos naturais ou farmacológicos classificados como quimiopreventivos são capazes de retroceder ou extinguir a carcinogênese (SURH, 2003). Assim, diante dessas propriedades, este pode ter sido um dos mecanismos que desencadearam a redução de tumores no presente estudo.

Outro mecanismo que pode ter sido responsável pela redução de tumores no presente estudo está relacionado com o efeito do ART C nas fases G0 e G1 do ciclo celular. Shimizu *et al.* (2005) realizaram um estudo utilizando esse fenólico em células colorretais humanas e verificaram que o ART C é capaz de estimular a expressão da proteína p21/Cip1. Esta proteína é capaz de reduzir ou inibir a atividade de ciclina D / CDK4 e da proteína Rb, responsáveis pela parada do ciclo celular quando há dano celular. Dessa forma, ocorre a prisão de células tumorais na fase de G0 / G1 do ciclo celular.

Além disso, estudos sugerem que antioxidantes exógenos contribuem para a prevenção de doenças graves e crônicas, como alguns tipos de câncer, quando estão presentes na dieta em quantidades significativas (CARRATU; SANTINI, 2005). Tan-No *et al.* (2006) relatam que a própolis verde tem potencial antioxidante devido aos flavonoides presentes em sua composição, capazes de eliminar os radicais livres e proteger a membrana celular contra a peroxidação lipídica. Os autores afirmam ainda que os efeitos anti-inflamatórios atribuídos à própolis verde podem estar relacionados a sua capacidade de reduzir os níveis celulares de H₂O₂ e NO. Como um dos mecanismos de ação da DXR é a geração de radicais livres, a ação antioxidante promovida pelos componentes da própolis verde pode ter sido responsável pela redução de tumores no presente estudo.

Contudo, os mecanismos diretamente envolvidos com a diminuição da frequência de tumores utilizando a própolis verde não foram diretamente avaliados neste estudo. Além disso, há uma carência de estudos clínicos randomizados a longo prazo em pacientes com câncer utilizando a própolis verde associada ao quimioterápico DXR. Dessa forma, sugere-se que novos estudos sejam realizados com esse propósito.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados na presente pesquisa, podemos concluir que a própolis verde não apresentou potencial carcinogênico nas concentrações testadas por meio do teste *warts* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Contudo, apresen-

tou potencial modulador, capaz de reduzir os danos induzidos pelo DXR. Assim, partindo dessa ação moduladora da própolis verde, podemos sugerir a possibilidade de sua utilização como quimiopreventivo, e possivelmente, como adjuvante no tratamento contra o câncer. Porém, são necessários novos estudos com ênfase em humanos, para que a ação preventiva e curativa da própolis verde seja completamente aceita em neoplasias.

REFERÊNCIAS

- BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo: patologia geral*. 5 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013.
- CANDIDO, C.D. *Avaliação de distribuição de doxorubicina incorporada em microemulsão lipídica em tecido tumoral e cardíaco em camundongos*. Dissertação - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2013.
- CARDOSO, A.C.M.; NEPOMUCENO, J.C. Avaliação do efeito modulador do óleo de alho (*Allium Sativum* L.) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, 12(1): 160-175, 2015.
- CARRÃO, D.B. *Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microsomas hepáticos*. 2015. 118 f. Mestrado - Curso de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Ribeirão Preto, 2015.
- CARRATU, B.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Ann Ist Super Sanità*, 41(1): 7-16, 2005.
- DANTAS, E.L.R. *et al.* Genética do câncer hereditário. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 55(3): 263-269, 2009.
- EEKEN, J.C.J *et al.* Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40(4): 277-282, 2002.
- FERRARI, C.K.B; TORRES, E.A.F.S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(3): 375-382, 2002.
- FILARDI, M.A. *Potencial Antitumoral de extratos da própolis brasileira e de folhas de graviola (Annona muricata): efeito citotóxico sobre células hepatocarcinogênicas HepG2*. Mestrado-Curso de Bioquímica Agrícola, Universidade Federal, Viçosa-MG, 2010.
- GOMES, R.A.P.L. Protocolo: utilização de *Drosophila* em Genética: 1ª Parte, 2001. Disponível em: <<http://www.ordemblogos.pt/Publicacoes/Biologias/Droshort%20-->

%2001Jan01.pdf >. Acesso em: 22 fev. 2017.

INCA. *Câncer: o que é*. Rio de Janeiro, 1996. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em: 20 fev. 2016.

JUSTICE, R. W. et al. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development*, 9 (1995):534-546.

LOPES, R. J. Dose alta de remédios naturais pode causar mutações, dizem estudos, 2008. Disponível em: <http://g1.globo.com/Noticias/Ciencia/0,,MUL764821-5603,00-DOSE+ALTA+DE+REMEDIOS+NATURAIS+PODE+CAUSAR+MUTACOES+DIZEM+ESTUDOS.html>. Acesso em: 21 de janeiro de 2017.

LORI, J. C.; STEIN, T. J.; THAMM, D. H. Doxorubicin and cyclophosphamide for the treatment of canine lymphoma: a randomized, placebo-controlled study. *Veterinary And Comparative Oncology*, 3(8):188-195, 2010.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3): 447-454, 2008.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19(1996): 529-536.

MANNING, G. *A introdução rápida e simples de Drosophila melanogaster*. 2008. Disponível em: <<http://www.ceolas.org/fly/intro.html>>. Acesso em: 27 fev. 2015.

MILLER, C. 2000. "*Drosophila melanogaster*". *Animal Diversity Web*. Disponível em: http://animaldiversity.org/accounts/Drosophila_melanogaster/. Acesso em 18 fevereiro 2016.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? *Experimentação Animal*, 60(2): 33-36, 2008.

MOREIRA, L.; ROGÃO, M.; ESTEVINHO, L. M. Própolis ao longo da história da humanidade. *O Apicultor: Revista de Apicultura*, 20(73): 21-24, 2011.

NASCIMENTO, C. S. et al. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Revista Brasileira de Farmácia*, 90(4): 334-339, 2009.

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3): 379-386, 2008.

- OLIVEIRA, P.F. et al. Evaluation of Genotoxicity and Antigenotoxicity of Artepillin C in V79 Cells by the Comet and Micronucleus Assays. *Journal Nutrition and Cancer*, 65 (2013): 1098-1103.
- PEREIRA, A.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25(2): 321-326, 2002.
- PEREIRA, G. B. et al. *Observação de indivíduos de Drosophila melanogaster*, 2008. Disponível em: http://www.mokidros.ibmc.up.pt/materiais_grupo_garcia/Relatorio1_Observacao_de_individuos.pdf. Acesso em: 21 fevereiro de 2017.
- PINTO, M. S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38(6): 278-283, 2001.
- RESENDE, F. et al. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research*, 634(2007): 112-118.
- RESENDE, P. A. *Avaliação citogenética da resposta ao tratamento quimioterápico em mulheres portadoras de câncer de mama*. 2007. Mestrado em Patologia Clínica. Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2007.
- RIBEIRO, C.R.; MACHADO, N.M. Avaliação do efeito anticarcinogênico do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*), por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, 13(22): 203-217, 2016.
- ROBERTO, M. M.; MORALES, M.A.M.; MALASPINA, O. *Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde e de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae), por meio de Sistema-Teste de Allium cepa e células de mamíferos (HTC)*. 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro - Sp, 2009.
- ROCHA, A.A.O.; ALVES, G.C.B., ORSOLIN, P.C. Efeito modulador do Roacutan® (isotretinoína) sobre a carcinogenicidade da doxorubicina, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. *Perquirere*, 12(2): 201-212, 2015.
- SEPEL, L. M N; LORETO, É. L S. Um século de *Drosophila* na genética. *Genética na Escola*, 2(5): 42-47, 2010.
- SHIMIZU, K. et al. Artepillin C in Brazilian Propolis Induces G0/G1 Arrest via Stimulation of Cip1/p21 Expression in Human Colon Cancer Cells. *Mol Carcinog.*, 44(4): 293-9, 2005.

SIDOROV, R. A. et al. Induction of tumor clones in *D. Melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutation Research*, 498 (2001): 181-191.

SILVA, C. E. V.; CAMACHO, A. A. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 57(3): 300-306, 2005.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(1): 768-78, 2003.

SZLISZKA, E. et al. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*, 41(3): 818-828, 2012.

SZLISZKA, E. et al. Chemical composition and anti-inflammatory effects of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, Thousand Oaks, 2013, pp. 1-13.

SZLISZKA, E. et al. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*, 38(4): 941-53, 2011.

TAN-NO, K. et al. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(1): 96-99, 2006

XIA, H. et al. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene*, 21(8): 1233-1241, 2002.