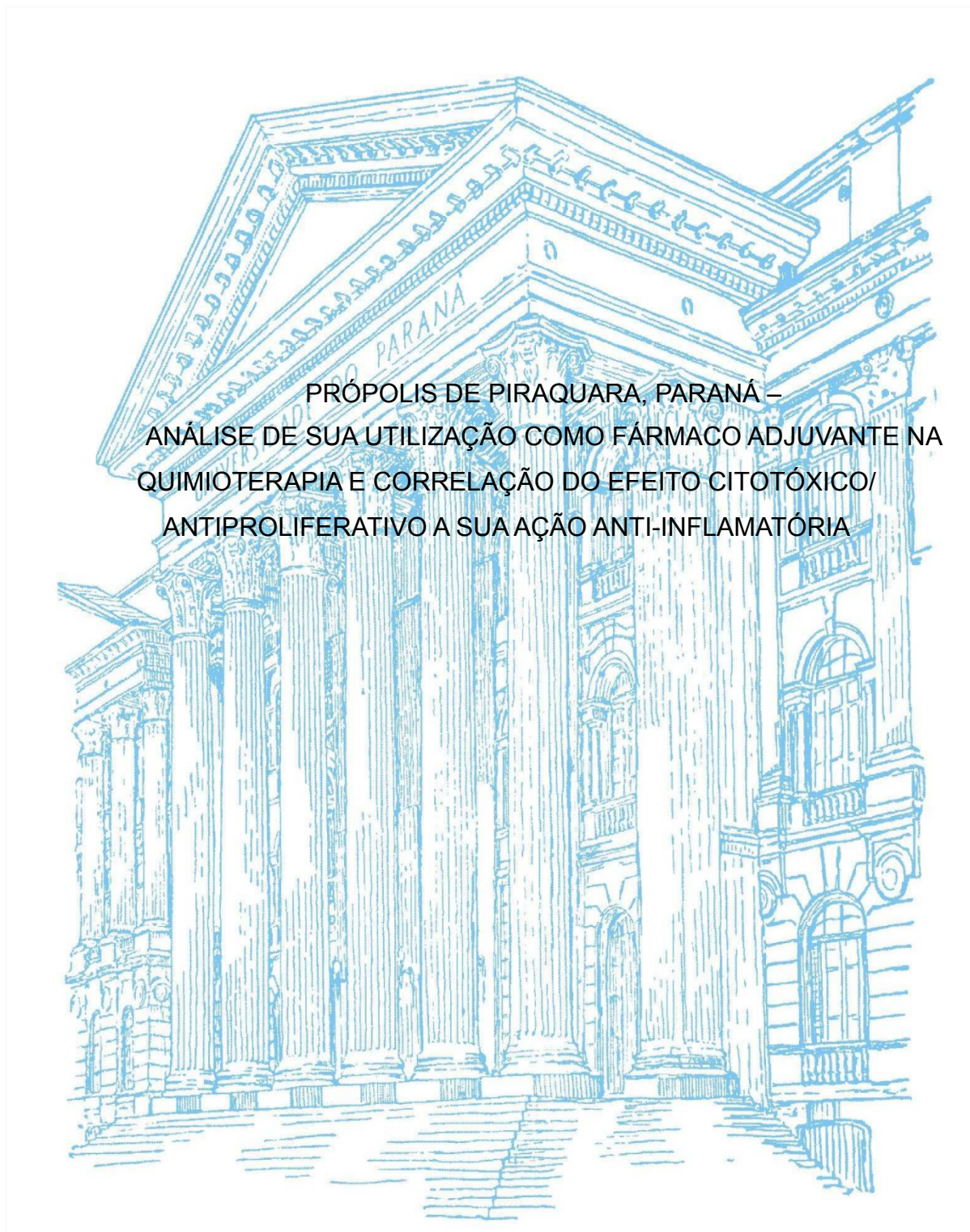


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZABEL DE CAMARGO



PRÓPOLIS DE PIRAQUARA, PARANÁ –  
ANÁLISE DE SUA UTILIZAÇÃO COMO FÁRMACO ADJUVANTE NA  
QUIMIOTERAPIA E CORRELAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO/  
ANTIPROLIFERATIVO A SUA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA

CURITIBA

2019

IZABEL DE CAMARGO

PRÓPOLIS DE PIRAQUARA, PARANÁ –  
ANÁLISE DE SUA UTILIZAÇÃO COMO FÁRMACO ADJUVANTE NA  
QUIMIOTERAPIA E CORRELAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO/  
ANTIPROLIFERATIVO A SUA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao curso de Graduação de Biomedicina, Setor  
de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
do Paraná, como requisito parcial à obtenção  
do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karina Bettega Felipe

CURITIBA

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Às integrantes do Laboratório FisiCel, em especial à minha orientadora, Karina, e à Mônica, sem as quais este projeto não teria acontecido.

À minha família, incluindo mãe, pai, irmão e Alisson, por todo o suporte emocional, financeiro e conselhos ao longo da minha graduação.

Aos meus amigos, Aloissa, Ana, Bianca, Bruna, Diego e Laremi, meus grandes companheiros nas horas de alegria e de completo desespero.

Ao meu doce namorado, Jeanluca, por todo o apoio e consolo durante os momentos mais tensos e delicados nesta jornada.

Por último, à Universidade Federal do Paraná, por ter proporcionado o local para a elaboração e execução dos experimentos descritos neste trabalho, e por ter propiciado meu encontro com tantas pessoas que influenciaram no desenvolvimento e continuidade deste estudo.

Baby, I'm just soggy from the chemo  
But counting down the days to go  
It just ain't living  
And I just hope you know  
That if you say  
Goodbye today  
I'd ask you to be true  
'Cause the hardest part of this  
Is leaving you  
(*Cancer, My Chemical Romance*)

## RESUMO

O câncer cervical é o quarto tipo mais comum entre mulheres no mundo todo. Estima-se que 90% dos casos ocorrem em função da infecção do epitélio cervical por estirpes do vírus HPV, característica que contribui para a evasão do sistema imune e formação de um microambiente tumoral inflamatório, aspectos determinantes da sobrevivência e progressão de vários tipos de tumor. Apesar de existirem métodos de prevenção e ser uma doença de evolução lenta, o diagnóstico geralmente ocorre em estágios mais avançados, os quais demandam terapias mais agressivas e com impacto negativo à qualidade de vida da paciente. Muitos estudos indicam o própolis como um produto de ótimo potencial anti-inflamatório e antitumoral, o que torna sua utilização promissora como coadjuvante à quimioterapia destinada ao tratamento do câncer. Desta forma, este trabalho visa observar se existe uma correlação do efeito antitumoral ao efeito anti-inflamatório de extrato de própolis, em modelos experimentais *in vitro*, bem como de avaliar se o tratamento com própolis é capaz de sensibilizar células de câncer cervical a ação do paclitaxel. Os dados obtidos demonstram que os três extratos avaliados não apresentaram efeito citotóxico e/ou antiproliferativo seletivo. A associação do paclitaxel ao extrato hexânico apresentou efeito antagônico. Por fim, verificou-se que o efeito antitumoral do mesmo extrato não está correlacionado a inibição de vias inflamatórias acionadas pelo óxido nítrico. Desta forma, conclui-se que o extrato hexânico não pode ser considerado como um adjuvante na quimioterapia do câncer cervical, sendo necessária a realização de mais estudos para elucidar a possível correlação entre o efeito antitumoral e anti-inflamatório da fração hexânica.

Palavras-chave: Câncer cervical. Tratamento. Própolis. Citotoxicidade. Adjuvante.

## ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common type among women around the world. About 90% of cases occur due to infection of the cervix epithelium by H P V virus strains, characteristic that contributes to imune system evasion and a inflammatory tumor microenvironment formation, determinant aspects for survival and progression of any tumor. Despite the existence of prevention methods and the disease's slow evolution, the diagnostic usually occurs in more advanced stages, which require more aggressive therapies and with negative impact to patient's quality life. Various studies indicate propolis as a product with great antitumor and anti inflammatory potential, which makes it useful as an adjuvant for cancer chemotherapy. This research aims to correlate the *in vitro* antitumor effect to the anti inflammatory effect of a propolis extract and to analyze its association with a cervical cancer's first line chemotherapy. All the three fractions utilized did not presented selective cytotoxicity and/or antiproliferative effect. The association between paclitaxel and the hexanic extract had an antagonistic efect, and the antitumor effect of the same extract is not correlated with an anti inflammatory effect. After these results, it is necessary to investigate the type of cell death and the anti-migratory and antiinvasive potential of the hexanic fraction..

Keywords: Cervical cancer. Treatment. Propolis. Cytotoxicity. Adjuvant.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – EVENTOS RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO E CÂNCER .....	17
<b>FIGURA 2</b> – CICLO DE INFECÇÃO DO HPV .....	20
<b>FIGURA 3</b> – ETAPAS SEGUIDAS PARA A OBTENÇÃO DOS DIFERENTES EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	34
<b>FIGURA 4</b> – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL IN VITRO .....	35
<b>FIGURA 5</b> – ISOBOLOGRAMA NORMALIZADO PARA RAZÃO DE CONCENTRAÇÕES NÃO CONSTANTES .....	37
<b>FIGURA 6</b> – ISOBOLOGRAMA NORMALIZADO DA COMBINAÇÃO ENTRE PACLITAXEL E $CI_{50}$ DO EXTRATO HEXÂNICO.....	41
<b>FIGURA 7</b> – CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PARA CÉLULAS HeLa TRATADAS COM $CI_{25}$ E $CI_{50}$ DO EXTRATO $C_6H_{14}$ .....	42

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PRINCIPAIS QUIMIOTERÁPICOS PRESCRITOS PARA O TRATAMENTO DE CARCINOMA CERVICAL.....</b>	<b>26</b>
--	-----------



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE PARA LINHAGENS TRATADAS COM EXTRATOS DE PRÓPOLIS.....	39
<b>TABELA 2</b> – ANÁLISE QUANTO AO TIPO DE EFEITO OBSERVADO PELA COMBINAÇÃO ENTRE PACLITAXEL E $CI_{50}$ DO EXTRATO HEXÂNICO .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	–	Ácido araquidônico
CC	–	Carcinoma cervical
CI	–	<i>Combination index</i>
CI <sub>25</sub>	–	Concentração inibitória mínima 25%
CI <sub>50</sub>	–	Concentração inibitória mínima
COX2	–	Ciclo-oxigenase 2
CTLA-4	–	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
DC	–	<i>Dendritic cell</i>
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DRI	–	<i>Drug reduction index</i>
EBRT	–	Radioterapia por feixe externo
ERN	–	Espécie reativa de nitrogênio
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
HIF-1 $\alpha$	–	Fator induzido por hipóxia-1 $\alpha$
HPV	–	Vírus do papiloma humano
IL-6	–	Interleucina-6
INCA	–	Instituto Nacional de Câncer
IS	–	Índice de seletividade
JAK	–	Janus quinase
KRAS	–	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
M-CSF	–	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MDSC	–	Myeloid derived supressor cell
MTT	–	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NF- $\kappa$ B	–	Fator nuclear-kappa B
NOS2	–	Óxido nítrico sintase 2
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
ON	–	Óxido nítrico
PACLI	–	Paclitaxel
PD-1	–	<i>Programmed death-1</i>
PD-L1	–	<i>Programmed death ligand-1</i>
PGE2	–	Prostaglandina E2

PNS	–	Pesquisa Nacional de Saúde
PR	–	Paraná
QT-RT	–	Quimioterapia concomitante à radioterapia
RT	–	Radioterapia
STAT3	–	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	–	<i>Tumor associated macrophages</i>
TGF- $\beta$	–	Fator de crescimento transformante $\beta$
UV	–	Ultravioleta
vcHPV	–	Vacina anti-HPV
VEGF	–	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR	–	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR2	–	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial tipo 2
WHO	–	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 CÂNCER – ASPECTOS GERAIS.....	16
2.2 CÂNCER E INFLAMAÇÃO .....	16
2.3 CÂNCER CERVICAL .....	19
2.3.1 HPV e fatores de risco .....	20
2.3.2 Diagnóstico e prevenção.....	22
2.3.3 Tratamento .....	23
2.4 UTILIDADES MEDICINAIS DO PRÓPOLIS .....	29
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS .....	33
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS .....	33
4.3 CULTIVO CELULAR .....	34
4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	34
4.4.1 Avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa do extrato etanólico e frações de própolis de Piraquara – PR .....	35
4.4.1.1 Avaliação de citotoxicidade e ou atividade antiproliferativa pelo sal de tetrazolium.....	35
4.4.2 MTT associado ao método de Chou-Talalay para verificação da sensibilização de células HeLa ao Paclitaxel .....	36
4.4.3 Dosagem de óxido nítrico .....	38
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
5.1 SELEÇÃO DO EXTRATO MAIS PROMISSOR .....	39
5.2 SENSIBILIZAÇÃO DA AÇÃO DO PACLITAXEL SOBRE CÉLULAS HeLa.....	40
5.3 CORRELAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO À CITOTOXICIDADE DO EXTRATO C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> .....	42
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de diversas doenças que surge quando uma célula adquire a capacidade de se replicar continuamente, de resistir à mecanismos de morte celular programada, de modificar seu metabolismo energético e de alterar a resposta do sistema imune, fazendo com que este não a reconheça como uma célula a ser eliminada ou que este corrobore para sua proliferação e propagação (HANNAHAN; WEINBERG, 2011; PÓVOA; FIOR, 2019).

O carcinoma cervical (CC) é um tipo de câncer maligno que acomete o cérvix uterino. A maioria dos casos (em torno de 90%) de CC é decorrente da infecção persistente pelo vírus HPV, ou papilomavírus humano, a qual facilita o recrutamento de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e outras células que corroboram a criação e manutenção de um microambiente inflamatório favorável à instalação e propagação tumoral (ŁANIEWSKI et al., 2018; PÓVOA; FIOR, 2019). Em escala global, esta patologia é o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres, e em torno de 60 a 85% das pacientes recebe o diagnóstico da doença em fases mais avançadas, em função da cobertura insuficiente do rastreamento por teste de Papanicolau e vacinação contra as estirpes de HPV de alto risco (KOH et al., 2019; REGALADO PORRAS et al., 2018).

Se as lesões neoplásicas forem detectadas precocemente, é possível realizar cirurgia conservadora para excisão tumoral (CASTLE et al., 2017) ou aplicar estratégias terapêuticas de ação local, como crioterapia, a fim de provocar a morte de células tumorais na porção cervical acometida (DE FOUW et al., 2019). Já em estágios mais tardios (carcinoma cervical localmente avançado ou metastático), é mais indicada a implementação de cirurgia radical (histerectomia), quimioterapia em conjunto com radioterapia e imunoterapia (COHEN et al., 2019).

Mesmo sendo procedimentos menos agressivos em comparação às demais técnicas, os métodos cirúrgicos e ablativos (de ação local) trazem prejuízos à qualidade de vida da paciente, uma vez que são capazes de causar hemorragia, linfedema, danos à nervos próximos à pelve e disfunções sexuais (MACDONALD; TIDY, 2016; TOMAO et al., 2016). As opções recomendadas

aos casos mais avançados possuem efeitos adversos ainda mais severos, (REGALADO PORRAS et al., 2018), e há o risco de a paciente adquirir resistência ao longo do tratamento (ZHU et al., 2016; BARBUTI; CHEN, 2015).

A suplementação com própolis, um produto ceroso produzido por abelhas operárias, demonstra eficácia na amenização de efeitos colaterais em humanos recebendo quimioterapia (PIREDDA et al., 2017). Estudos *in vitro* sugerem que o própolis pode ser associado à quimioterápicos para potencializar o efeito antineoplásico destes (BERNARDINO et al., 2018). Ainda, dados da literatura relatam a ação do própolis sob a modulação de genes que atuam em processos inflamatórios e oncogênicos (DOI et al., 2017).

Assim, este trabalho objetiva correlacionar, de modo preliminar, os efeitos anti-inflamatório e antitumoral de diferentes extratos de própolis de *Apis mellifera* coletado de Piraquara – PR, verificando a ação destes sobre o efeito de antineoplásicos utilizados clinicamente o tratamento do câncer cervical.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER – ASPECTOS GERAIS

Segundo Hannahan e Weinberg (2011), uma célula normal torna-se uma célula neoplásica ao obter, progressivamente, funções ou características necessárias ao crescimento e disseminação de células malignas, as quais incluem: proliferação celular sustentável; evasão de supressores do crescimento; evasão da destruição pelo sistema imune; imortalidade replicativa; ativação da migração celular e invasão; indução da angiogênese, resistência à morte celular; desregulação do metabolismo energético; instabilidade e mutação genômica e inflamação pró-tumoral.

A oncogênese é iniciada e progride em razão da interação entre fatores genéticos e agentes externos. Mutações somáticas – referentes às mutações originadas em um tecido apenas – ou germinativas – presentes em todas as células do organismo – são as causas primárias da transformação de uma célula benigna em maligna (WARD, 2002). Já os fatores externos podem ser de origem física (radiação UV, por exemplo), química (componentes da fumaça do cigarro) ou biológica (infecções virais ou bacterianas) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019).

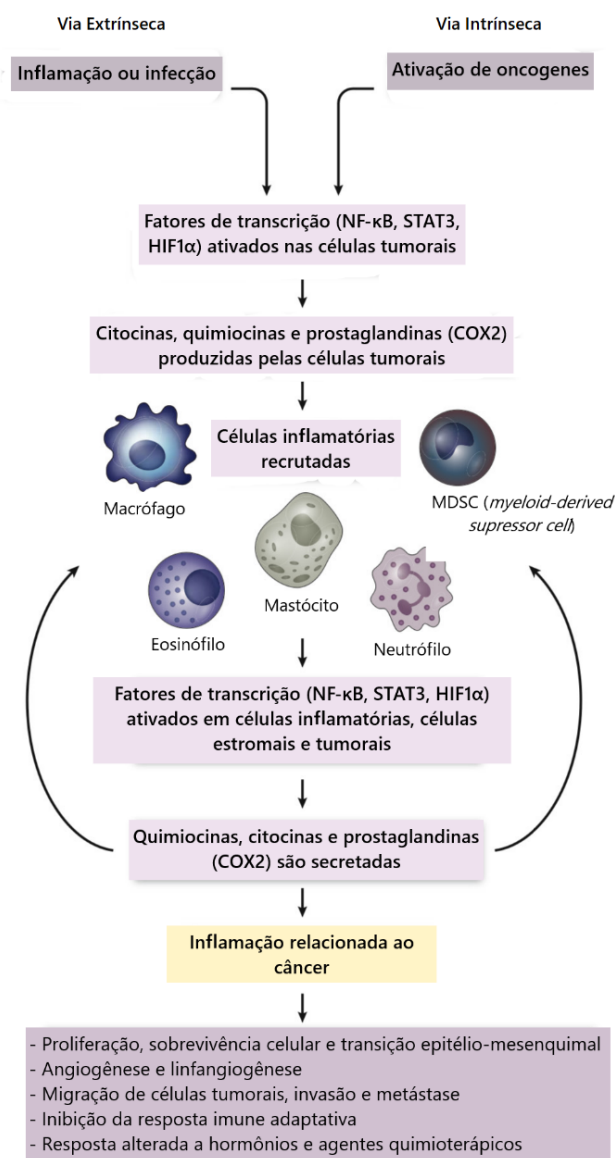
Para o biênio 2018-2019, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou a ocorrência de aproximadamente 630.000 novos casos de câncer no Brasil, e registrou mais de 200.000 óbitos em função desta doença em 2016 (BRASIL. Instituto Nacional de Câncer, 2019). A Organização Mundial da Saúde estimou a morte de 9,6 milhões de pessoas em decorrência de neoplasias malignas pelo mundo em 2018, e afirma que uma em cada seis mortes são relacionadas ao câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019).

### 2.2 CÂNCER E INFLAMAÇÃO

Estudos epidemiológicos e moleculares demonstram que o câncer e a inflamação são processos interconectados. A inflamação, aliada a fatores comportamentais, ambientais e genéticos, é capaz de induzir a transcrição gênica de fatores relacionados à formação de um microambiente inflamatório–

quimiocinas, citocinas e prostaglandinas – e que são comuns à carcinogênese (MANTOVANI et al., 2008). Estes eventos levam ao recrutamento de macrófagos, mastócitos e neutrófilos, células que expressam fatores de transcrição que ampliam a inflamação local e promovem a incorporação de células do sistema imune e seus produtos no microambiente inflamatório tumoral, fenômeno essencial ao início e evolução de neoplasias malignas (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018; SHRIHARI, 2017).

**FIGURA 1 - EVENTOS RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO E CÂNCER**



Células tumorais, por influência da ativação de oncogenes, inflamação crônica não solucionada e infecção por patógenos, expressam fatores transcripcionais e secretam mediadores inflamatórios a fim de recrutar células do sistema imune ao microambiente tumoral. As células inflamatórias cooptadas, então, secretam substâncias que contribuirão ao crescimento e disseminação das células neoplásicas.

FONTE: Adaptado de Mantovani (2008).



O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) coordena respostas imunes e inflamatórias, e sua ativação constitutiva estimula a proliferação e migração celular, invasividade e inibição da apoptose em células tumorais (AGUIAR et al., 2017; CAPECE et al., 2018). A ativação da via JAK/STAT3 (do inglês: *janus quinase/signal transducer and activator of transcription 3*) interfere positivamente no crescimento e sobrevivência tumoral (MANTOVANI et al., 2008). Além disso, algumas células cancerígenas ativam o fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ , promovendo a metabolização da glucose pela via glicolítica e a geração de lactato, o qual auxilia na migração, invasão e escape do sistema imune (HAYASHI et al., 2019).

Outro mecanismo das células neoplásicas para aumentar suas chances de sobrevivência e disseminação é induzir a imunotolerância no microambiente tumoral, a fim de evitar respostas tumorocidas de células inflamatórias. Este processo ocorre, por exemplo, em macrófagos infiltrados no microambiente tumoral, ou TAMs (do inglês: *tumor associated macrophages*). Estes fagócitos, ao entrarem em contato com as citocinas IL-4 ou IL-13, polarizam-se no subtipo M2, que possuem funções de reparo tecidual capazes de favorecer a progressão tumoral, tais como estimulação da angiogênese e linfangiogênese e secreção de IL-10 e TGF- $\beta$  (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

Células dendríticas são responsáveis por fagocitar e apresentar antígenos a células T efetoras. As DCs (do inglês: *dendritic cells*) imaturas adquirem a maturação ao se encontrarem com antígenos no tecido periférico, tornando-as em potentes ativadoras de linfócitos TCD4+ e TCD8+ e em uma peça-chave na imunidade contra o câncer (HAAS; OBENAU, 2019). Portanto, inibir a maturação de tais células ou seu recrutamento compromete a consolidação de uma resposta imune antitumoral adaptativa em favor da eliminação de células malignas. Isto pode ocorrer pela ativação da via JAK/STAT3 em células do tumor e do sistema imune (MANTOVANI et al., 2008), secreção das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  por TAMs e a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018).

Sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA) contido nos fosfolipídios de membrana, as prostaglandinas são lipídios bioativos que participam tanto na homeostase tecidual quanto na inflamação, como uma molécula pró-

inflamatória. Uma das mais relevantes é a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a qual possui receptores acoplados à proteína G e nucleares que atuam na transdução de sinais e transcrição gênica de fatores essenciais à reorganização tecidual, incluindo promoção da angiogênese e diminuição da transcrição de moléculas de adesão. A expressão aumentada de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e PGE<sub>2</sub> sintase microssomal, bem como a redução dos níveis de proteínas que catabolizam e inativam tais moléculas são estratégias adotadas pelas células tumorais para que haja acúmulo de prostanoídes, em especial PGE<sub>2</sub>, para que a mesma favoreça os processos migração e invasão tumoral (MENTER; DUBOIS, 2011).

O óxido nítrico é um transmissor gasoso conhecido por ações como: relaxamento de músculos lisos, vasodilatação, decréscimo da agregação plaquetária, inativação pós-traducional de proteínas oncogênicas (NF- $\kappa$ B e metaloproteinase-9) ou supressoras tumorais, (caspases-3 e caspase-9), assumindo assim, um papel tanto na inibição como na progressão do câncer (KASHFI; VANINI, 2019).

Em células normais, a proteína p53 regula negativamente a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2). Portanto, modificações na atividade normal da p53 (reduzido em pelo menos 60% dos cânceres) elevam o fluxo de ON, e indícios sugerem que, na faixa de 100 a 400 nM, o sinalizador gasoso interfere em sistemas de reparo do DNA, influencia na ativação de vias de sinalização para sobrevivência e proliferação celular, além de elevar a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), as quais podem causar dano ao material genético, contribuindo dessa forma, para o desenvolvimento e progressão tumoral (SOMASUNDARAM et al., 2019).

### 2.3 CÂNCER CERVICAL

Considerado o terceiro tipo de câncer mais registrado entre mulheres e o quarto colocado em se tratando da mortalidade por câncer em indivíduos do mesmo gênero no Brasil, o câncer cervical, ou câncer de colo de útero, é provocado principalmente pela infecção persistente por cepas oncogênicas do Papilomavírus Humano (HPV). O câncer cervical acomete o cérvix uterino, que

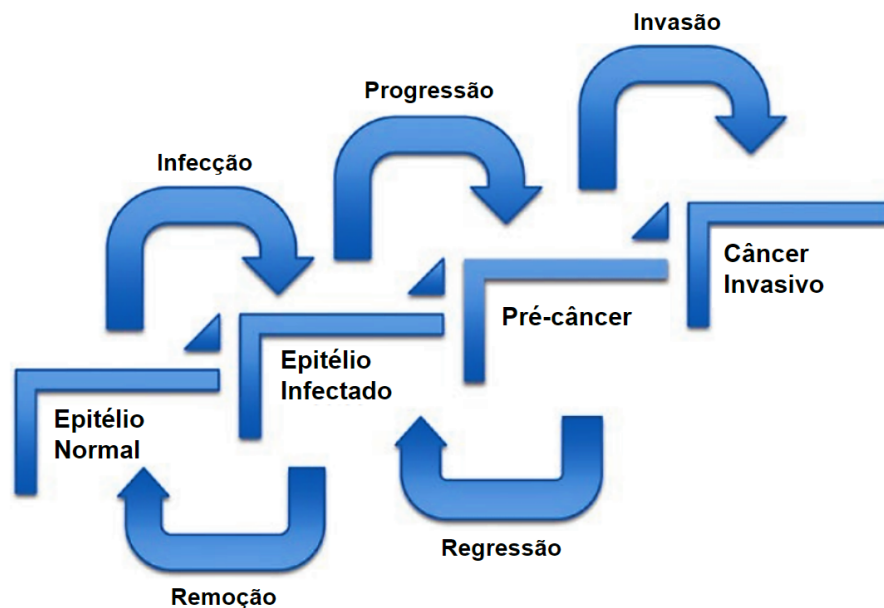
trata-se da parte inferior do útero (BHATLA et al., 2018; BRASIL. Instituto Nacional de Câncer, 2019).

### 2.3.1 HPV e fatores de risco

O Papilomavírus humano (HPV) pertence à família Papillomaviridae, composta por pequenos vírus não envelopados icosaédricos, que apresentam DNA dupla fita. Os gêneros identificados até o momento são alfa, beta, gama, mu e nu, sendo que os alfa-HPV infectam majoritariamente regiões de mucosa e os demais gêneros afetam o epitélio cutâneo (GHEIT, 2019). Sua transmissão pode ser dada pelo compartilhamento de objetos pessoais (lençóis ou toalhas) de pessoas infectadas ou pelo contato sexual (AGGARWAL, 2019; GHEIT, 2019).

Acredita-se que, em algum momento, homens e mulheres sexualmente ativos entrarão em contato com o HPV, desenvolvendo um quadro infeccioso. Entretanto, em 90% dos indivíduos, a infecção é reprimida pelo sistema imune em cerca de 24 meses. Já nos 10% restantes, a infecção persiste como um ciclo que pode levar anos ou décadas para alcançar o estágio de câncer invasivo (ver FIGURA 3). A recorrência das infecções e incubação viral estão fortemente ligados à idade avançada e ao fato dos indivíduos possuírem múltiplos parceiros sexuais (AGGARWAL, 2019).

**FIGURA 2 - CICLO DE INFECÇÃO DO HPV**



O ciclo ilustrado consiste na infecção do epitélio cervical normal, *clearance* da infecção pelo HPV, progressão ao estágio pré-neoplásico, regressão do epitélio aos estados infectado e normal, e progressão ao estágio de câncer invasivo. Esta última fase pode ocorrer anos ou décadas após a infecção inicial.

FONTE: Adaptado de Aggarwal (2019).

Os tipos HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58 e 59 são os que representam os agentes etiológicos de maior risco para a formação de tumores ginecológicos (câncer cervical, câncer de vagina, de vulva), urológicos (câncer peniano, testicular), do trato anogenital (câncer de bexiga, de ânus) e de cabeça e pescoço (câncer orofaríngeo) (CAI et al., 2018; GHEIT, 2019). Já os de menor risco (HPV6 e 11) podem promover o desenvolvimento de lesões benignas no trato respiratório, no trato gastrointestinal superior, na região ocular, além de causarem verrugas genitais (AGGARWAL, 2019).

O HPV possui vários mecanismos de evasão do sistema imune, dentre eles pode-se citar: a replicação viral não-citolítica, a qual evita a ativação de respostas inflamatórias fundamentais ao recrutamento de células da resposta imune inata e adaptativa; ações imunossupressoras através do aumento da produção e secreção de IL-6 e PGE<sub>2</sub> pelas células transformadas com o vírus; ativação da via JAK/STAT3 em monócitos, fazendo com que macrófagos se acumulem no microambiente cervicovaginal, e promoção do fenótipo de macrófagos M2, os quais suprimem a atividade de células citotóxicas operantes na remoção do HPV no organismo (SMOLA, 2019).

Cerca de 83% dos casos de câncer cervical apresentam integração do DNA do HPV à célula hospedeira, processo que geralmente acarreta na perda da regulação da expressão das proteínas virais E6 e E7 (GHEIT, 2019), as quais exercem efeitos oncogênicos, tais como: I) promovem a inibição de p53 e de pRb, (FARIDI, 2011); II) elevam a transcrição dos genes *MYC* (DANG, 2012), *KRAS* (BANG et al., 2013) e *FOS* (CHEN et al., 2019); e III) induzem células diferenciadas da lâmina supra basal do colo uterino a reentrar na fase S do ciclo celular (AGGARWAL, 2019).

O tabagismo é um hábito aparentemente ligado à predisposição e à progressão do câncer cervical após a infecção pelo HPV. Os mecanismos de ação propostos para explicar a relação entre um e outro compreendem eventos epigenéticos (mudanças na expressão de DNA metiltransferases em células expostas à nicotina e fumaça do cigarro), anormalidades no sistema imune dos

fumantes (supressão da atividade de linfócitos T, redução dos níveis de imunoglobulinas no plasma, desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias), presença de benzo(a)pireno no muco cervical de fumantes, metabólito carcinogênico que propicia a amplificação do genoma do HPV e aumenta a probabilidade de integração do DNA viral e danos causados diretamente pela nicotina ao DNA das células epiteliais do colo do útero (FONSECA-MOUTINHO, 2011).

O Instituto Nacional de Câncer (2019) aponta o uso de contraceptivos hormonais como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Porém, o período de latência da patologia, usualmente de anos ou décadas, variações na composição de cada pílula anticoncepcional e tempo ou interrupção do seu uso dificultam os estudos de caráter associativo (KHATUN et al., 2018).

Em suma, os fatores e cofatores de risco que culminam no desenvolvimento de um câncer cervical resumem-se à infecção persistente pelo vírus HPV, sobretudo das cepas HPV16 e HPV18, histórico reprodutivo e sexual (idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, utilização de métodos contraceptivos hormonais) e a ineficiência do sistema imune em reconhecer e combater infecções do cérvix uterino pelo HPV (BRASIL. Instituto Nacional de Câncer, 2019; GHEIT, 2019).

### 2.3.2 Diagnóstico e prevenção

A identificação de lesões celulares pré-cancerosas ou cancerosas é feita através da coleta de amostra para esfregaço cervical e posterior exame citopatológico, conhecido como exame Papanicolau. No Brasil, é o método utilizado para o rastreamento e prevenção do câncer de colo uterino, por ser de baixo custo, indolor e eficaz (DA SILVA et al., 2019).

A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), à respeito da realização do exame Papanicolau por mulheres na faixa etária dos 25 a 64 anos que já tiveram relação sexual – população alvo, segundo o Ministério da Saúde –, verificou que menos de 80% destas fizeram ao menos um exame nos últimos três anos. Além disso, foi constatado que a cobertura foi maior no grupo de mulheres entre 35 e 54 anos, brancas, com alto grau de escolaridade e

residentes da área urbana, evidenciando diferenças sociodemográficas e socioeconômicas do programa (OLIVEIRA et al., 2018). Outro problema verificado no mesmo estudo (OLIVEIRA et al., 2018) foi relacionado ao seguimento completo de mulheres que apresentaram alterações citopatológicas significativas, em especial devido ao atraso entre o recebimento, confirmação diagnóstica e o início do tratamento.

Os exames diagnósticos fazem parte das medidas preventivas do carcinoma cervical, em conjunto com o uso do preservativo de barreira (camisinha) nas relações sexuais, a fim de evitar a transmissão sexual do HPV, e da vacinação (vcHPV), a qual é utilizada para induzir a imunização (BRASIL, Ministério da Saúde, 2019).

O Ministério da Saúde (2017), entretanto, admite que a transmissão do HPV via relação sexual não é barrada totalmente, mesmo com o uso de preservativo, pois é possível que haja lesões em áreas desprotegidas pelo mesmo, tais como vulva, bolsa escrotal, e região pubiana. Quanto à vacinação, uma revisão sistemática executada por da Silva et al. (2019) constatou que a taxa de aceitação – compreensão da função preventiva imunobiológica e intenção voluntária de recebê-lo – é superior à taxa de adesão à vcHPV – ato efetivo de vacinar-se e completar o esquema –, o que pode dificultar o controle do câncer cervical e dos indicadores de morbi e mortalidade relacionados ao Papilomavírus humano em decorrência da cobertura vacinal insatisfatória, advinda da falta de participação dos pais na imunização preconizada aos adolescentes, do receio de que a vacinação resulte num estímulo ao ato sexual e das informações sem evidências científicas disseminadas em redes de comunicação quanto ao seu propósito.

### 2.3.3. Tratamento

A estratégia atual preferível para tratar carcinoma cervical *in situ* em estágios micro invasivos é a remoção cirúrgica do tumor (DUEÑAS-GONZÁLEZ; CAMPBELL, 2016). Através dos métodos excisionais, é possível remover a massa tumoral, seja pela retirada completa do útero e cérvix (histerectomia total) ou pela retirada de parte do cérvix uterino (cirurgia conservadora) (CASTLE et al., 2017), e retardar ou impedir a infiltração de

células tumorais no espaço linfático e/ou vascular (DUEÑAS-GONZÁLEZ; CAMPBELL, 2016). Os procedimentos mais extremos, entretanto, podem provocar co-morbidades crônicas, como disfunções sexuais, intestinais e urinárias, danos aos nervos do sistema autônomo, hemorragia, linfedema (MACDONALD; TIDY, 2016), além de comprometer a fertilidade (TOMAO et al., 2016). Neste sentido, várias intervenções cirúrgicas que preservam o trato reprodutor feminino foram inseridas na prática clínica para substituir a utilização de histerectomia radical em mulheres na idade reprodutiva com lesões pequenas (TOMAO et al., 2016), sendo mais apropriadas à pacientes jovens, com bons fatores prognósticos e com tumor operável, sem uso de terapias adjuvantes (BENTIVEGNA et al., 2016).

Os tratamentos ablativos usam temperaturas muito baixas (crioterapia) ou altas (coagulação térmica) para induzir a necrose das células infectadas por HPV (CASTLE et al., 2017), por meio da aplicação de gases refrigerados ou eletricidade, respectivamente, na porção do tecido anormal (DE FOUW et al., 2019). É aconselhado que tais terapias sejam implementadas logo após o diagnóstico de uma lesão cervical, sob as condições de ser pré-invasiva (estado pré-maligno ou inicial) e não exceder 75% da área superficial do cérvix (BASU et al., 2017). Estes métodos são utilizados tanto em países de alta como de baixa e média renda, e são alternativas que apresentam um ótimo custo benefício ao tratamento do carcinoma cervical não invasivo (BASU et al., 2017). Em particular, a coagulação térmica é mais indicada em países com assistência médica precária, relacionada a qualidade de infraestrutura e preparo profissional, quando comparada à crioterapia (DE FOUW, et al., 2019). Porém, faltam estudos de comparação entre possíveis diferenças na eficácia e segurança entre as duas técnicas, o impacto da aplicação de determinados protocolos nestes critérios, e a avaliação de efeitos colaterais e do risco de falhas com o uso de alguma destas terapias (DE FOUW, et al., 2019).

Para o carcinoma de colo uterino localmente avançado, sugere-se o uso de radioterapia (RT) adjuvante pós-operatória às pacientes com risco de recidiva ou morte de 30% ou mais, caso seja implementada somente a cirurgia; se o risco de recidiva for de 40% e o risco de morte somente com tratamento cirúrgico for superior a 50%, utiliza-se a quimioradioterapia (QT-RT) (COHEN et al., 2019; REGALADO PORRAS et al., 2018).

A radioterapia promove a apoptose das células anormais pela indução de danos ao DNA e, principalmente, em decorrência de mitose aberrante, pela radiação ionizante (ERIKSSON; STIGBRAND, 2010). Na terapia adjuvante pós-operatória, a radiação pélvica pode atingir sítios tumorais ocultos, como tecido vaginal e linfonodos pélvicos (COHEN et al., 2019). Algumas modalidades proporcionam bom controle da progressão do tumor e preservam órgãos adjacentes, como bexiga, intestino delgado e reto, e assim diminuem a toxicidade aos tecidos saudáveis (COHEN et al., 2019; SMALL et al., 2017). Ainda assim, alguns eventos adversos de intensidade leve à moderada podem ocorrer, como inflamação anal e retal, cistite, diarreia, dermatite, enterite, linfedema e fissuras anogenitais (YUCE SARI et al., 2017). A individualização de tais tratamentos é promissora para diminuir ainda mais a toxicidade gerada pelo tratamento e torná-lo mais eficaz (VORDERMARK, 2016), mas este planejamento requer técnicas de imagem avançadas, como tomografia computadorizada e imagem por ressonância magnética, infraestrutura e recursos em condições ideais, o que dificulta e inviabiliza sua aplicação em países economicamente desfavorecidos (SMALL et al., 2017).

A quimiorradiação é recomendada aos casos com risco elevado de recidiva (COHEN et al., 2019) e em casos mais avançados, como o câncer cervical metastático (LI et al., 2016). A administração de cisplatina foi apontada como o método que garante os melhores índices de sobrevida e tempo de sobrevida livre de progressão da doença (DUEÑAS-GONZÁLEZ; CAMPBELL, 2016; FALCETTA et al., 2016; VORDERMARK, 2016). Já a adição da radioterapia parece sensibilizar as células tumorais aos quimioterápicos, ao inibir mecanismos de reparo do DNA (REGALADO PORRAS et al., 2018). O paclitaxel, representante da classe dos taxanos, é outro quimioterápico com notória atividade citotóxica contra células de tumores cervicais, e sua utilização tem se mostrado relevante no tratamento de câncer cervical recorrente (SCHWAB et al., 2014). Ambos os quimioterápicos apresentam efeitos colaterais severos (ver QUADRO 1) e que podem levar à descontinuação do tratamento, sendo que a cisplatina é mais reconhecida pela nefrotoxicidade (OUN et al., 2018) e o paclitaxel por provocar mielossupressão e neuropatia (CROWN; O'LEARY, 2000).



**QUADRO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE OS PRINCIPAIS QUIMIOTERÁPICOS PRESCRITOS PARA O TRATAMENTO DE CARCINOMA CERVICAL**

<b>Fármaco</b>	Cisplatina	Paclitaxel
<b>Classe Farmacológica</b>	Composto de Platina	Taxano
<b>Mecanismo de Ação</b>	Ligação covalente às bases nitrogenadas do DNA (BARRA; NETO, 2015)	Estabilização de microtúbulos celulares (CROWN; O'LEARY, 2000; BARBUTI; CHEN, 2015)
<b>Efeitos Adversos</b>	Nefrotoxicidade, citopenia, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, caquexia, alopecia (OUN et al, 2018)	Mielossupressão, neuropatia, mialgia, fadiga, alopecia, diarreia (CROWN; O'LEARY, 2000; BARBUTI; CHEN, 2015)

Quadro comparativo quanto à classe farmacológica, mecanismo de ação e principais reações adversas dos quimioterápicos cisplatina e paclitaxel.

FONTE: O Autor.

Para aumentar a taxa de resposta nos casos mais graves, é indicada a quimiorradioterapia com dois fármacos antineoplásicos de classes distintas (REGALADO PORRAS et al., 2018), sendo a associação de cisplatina e paclitaxel o tratamento de primeira escolha (ZHU et al., 2016). A quimioterapia adjuvante à quimiorradioterapia, pode ser aplicada, caso seja detectada metástase em nódulos linfáticos distantes da região pélvica (para-aórticos e supra claviculares, por exemplo) (LI et al., 2016) ou como tratamento paliativo desta condição (metástase) (DUEÑAS-GONZÁLEZ; CAMPBELL, 2016).

Uma das desvantagens mais expressivas da quimiorradioterapia concomitante é a intensificação dos efeitos adversos, como hematotoxicidade, irritação da bexiga, do retossigmóide, e complicações geniturinárias, principalmente na combinação de radioterapia e o duplete de quimioterápicos (REGALADO PORRAS et al., 2018), fator que limita sua prescrição (COHEN et al., 2019), junto ao possível desenvolvimento de resistência tumoral por mecanismos intrínsecos ou adquiridos, os quais impedem a ação e o efeito tanto da cisplatina (ZHU et al., 2016), como do paclitaxel (BARBUTI; CHEN, 2015).

Atualmente, as terapias antiangiogênicas contra o câncer cervical avançado têm sido apoiadas pelas evidências moleculares, histopatológicas e clínicas que indicam sua eficácia (TEWARI et al., 2018), e propõe-se o seu

enquadramento como terapia alvo-específica (TOMAO et al., 2014). O anticorpo monoclonal humanizado bevacizumabe (Avastin®), o qual se liga ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) extracelular para prevenir sua associação aos seus receptores (VEGFRs), é um dos tratamentos mais estudados. Às pacientes com câncer cervical recorrente, persistente ou metastático, é indicada a combinação do bevacizumabe com cisplatina e paclitaxel. Embora possa reduzir o crescimento e progressão das células tumorais, tal associação provoca inúmeros efeitos adversos, como perfuração gastrointestinal, dificuldade de cicatrização de feridas, eventos trombóticos, problemas cardiovasculares, hemorragia, complicações renais, fadiga, cefaleia, rinite, lacrimejamento, hipertensão, proteinúria e alteração no paladar (Estados Unidos. GENENTECH, 2019).

O apatinib é um outro fármaco antiangiogênico, o qual atua inibindo seletivamente a ativação de receptores VEGFR2, cuja superexpressão foi correlacionada positivamente com carcinomas cervicais mais avançados e metástase linfonodal (QIU et al., 2018). Qiu et al. (2018) relataram, pela primeira vez, que o tratamento de câncer cervical SiHa e Hcc94 com o apatinib é capaz de modificar o padrão de expressão gênica de tais células, promovendo a supressão de genes atuantes na progressão do ciclo celular, proliferação e apoptose, bem como inibindo a ativação transcricional de p53 e TGF- $\beta$ . O mesmo estudo mostrou que a associação de apatinib com paclitaxel potencializou o efeito antiproliferativo e citotóxico *in vitro* do taxano, assim como seu efeito antitumoral *in vivo*. Desta forma, a perspectiva é de que este agente possa ser aplicado na terapia de pacientes com câncer cervical recorrente que não tenham respondido aos esquemas mais indicados de quimioterapia (CHEN et al., 2019).

Apesar de provocar efeitos colaterais de baixa intensidade na maioria dos pacientes, há casos descritos em que a toxicidade do apatinib levou à quadros graves de hipertensão, albuminúria, trombocitopenia e anemia (CHEN et al., 2019), não sendo possível afirmar até então, o custo-benefício de tal terapia à pacientes com câncer cervical avançado.

A fim de atender às pacientes com câncer cervical avançado e persistente não responsivas às terapias antiangiogênicas e tratamentos de primeira linha, começou-se a estudar outras medidas que promovessem a

regressão da doença; uma delas é a imunoterapia, a qual utiliza substâncias que estimulam o sistema imune – citocinas, anticorpos monoclonais conjugados ou não à toxinas, radioisótopos e drogas antineoplásicas –ou a transferência adotiva de células autólogas da resposta imune (DADAR et al., 2018). Sua implementação é particularmente interessante a cânceres induzidos por vírus, já que os antígenos virais gerados durante o processo de malignização são capazes de iniciar uma resposta imune pela apresentação de antígenos às células T, as quais evocam respostas de eliminação de células infectadas com o vírus ao se diferenciarem em células T efetoras (MINION; TEWARI, 2018). Uma estratégia imunoterapêutica com grande potencial é a inibição de inibidores de checkpoint de linfócitos e outros elementos celulares deste sistema, com o intuito de regular positivamente a proliferação de linfócitos T e facilitar a destruição de células infectadas (MINION; TEWARI, 2018).

O CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) foi o primeiro inibidor de checkpoint do sistema imune a ser investigado clinicamente. Sua função fisiológica é reduzir a amplificação de linfócitos T para prevenir uma superestimulação do sistema imune. Sabe-se que células tumorais expressam ligantes de CTLA-4 em sua superfície, suprimindo dessa forma, a ativação de linfócitos T microambiente tumoral (DADAR et al., 2018; MINION; TEWARI, 2018). Um ensaio clínico de fase 1 e 2 (LHEUREUX et al., 2018) avaliou a eficácia do anticorpo monoclonal humanizado ipilimumabe (um inibidor de CTLA-4), já aprovado para o tratamento de melanoma nos Estados Unidos em pacientes com câncer cervical recorrente e avançado. Porém concluiu-se que, mesmo com ativação imunológica significativa, a resposta induzida não foi direcionada à remissão do câncer. Foi visto também que, possivelmente, muitos pacientes poderiam desenvolver resistência ao ipilimumabe através da indução da expressão de outro inibidor de checkpoint imune, denominado PD-1.

O PD-1 (*programmed death-1*), junto ao PD-L1 (*programmed death ligand-1*) constituem uma via que atua na restrição de danos causados pelo processo inflamatório em tecidos saudáveis. Contudo, em tecidos com infecção crônica por vírus, esta via promove tolerância imunológica das células T (MINION; TEWARI, 2018), e no caso de carcinomas cervicais, mais de 90%

dos tumores expressam PD-L1 (ENWERE et al., 2017), o que sugere a participação desta via na promoção de um ambiente propício ao desenvolvimento de lesões neoplásicas neste tecido. Dentre os anticorpos monoclonais anti-PD-1, o único aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de pacientes com câncer cervical metastático e recidivante, foi o pembrolizumabe. Entretanto, foi relatado que o tratamento susceptibilizou as pacientes ao desenvolvimento de infecções, anemia, hemorragia e fistulas (LIU et al., 2019).

## 2.4 UTILIDADES MEDICINAIS DO PRÓPOLIS

Uma das funções das abelhas operárias é produzir própolis, uma substância cerosa originada da modificação de resinas coletadas de folhas de árvores e outras fontes vegetais, por enzimas contidas na saliva destes insetos (LEMOS JÚNIOR; LEMOS, 2013). A partir disso, a mistura rica em ativos como flavonoides, ácidos fenólicos, óleos voláteis e metais essenciais (magnésio, zinco e cálcio, por exemplo), pode ser aplicada em lacunas presentes na colmeia e no embalsamento de insetos invasores (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Devido à diversidade da flora nas localidades em que as colmeias possam se estabelecer e diferenças na maquinaria enzimática entre as espécies de abelhas, a composição do própolis é extremamente variável (CASTALDO; CAPASSO, 2002), sobretudo no Brasil, por este país conter uma biodiversidade singular em sua extensão territorial (LIMA et al., 2016).

A maioria dos estudos de investigação das atividades biológicas de própolis é desenvolvida com própolis derivado de abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera*, proveniente do cruzamento de espécies do continente africano e do continente europeu. Isto se deve ao valor agregado de seu produto quando comparado aos de outras espécies de abelhas (FRANCHIN et al., 2018). Suas propriedades farmacológicas incluem: ação hepatoprotetora, anti-ulcerativa, antimicrobiana, combate ao diabetes e a alergias do trato respiratório, atividade antioxidante, imunomodulatória, anti-inflamatória e antitumoral, por exemplo (CASTALDO; CAPASSO, 2002; LEMOS JÚNIOR; LEMOS, 2013; NAKAJIMA et al., 2009; SFORCIN; BANKOVA, 2010). Em geral, seu consumo e utilização via suplementação dietética é bem tolerado, tendo

como maior complicação o desenvolvimento de reações alérgicas, que na maioria dos casos, se expressa como dermatite de contato localizada, seja por hipersensibilidade à componentes do própolis, seja por reatividade cruzada (FREEDMAN; GRIGGS, 2019).

Há muitas evidências da ação antiproliferativa e citotóxica *in vitro* do própolis. Foi demonstrado que dois componentes isolados do própolis de *Apis mellifera* tailandesa (cardol e cardanol), apresentaram citotoxicidade sob linhagens de câncer mamário, pulmonar, hepático, gástrico e de cólon (TEERASRIPREECHA et al., 2012). Outro estudo, conduzido com o extrato etanólico de propólis advindos de duas espécies - *Apis mellifera* e *Plebeia droryana* – demonstrou que os mesmos induziram necrose em células da linhagem K562, originárias de leucemia mielóide crônica humana (BONAMIGO et al., 2017). Ainda, verificou-se que os própolis da Croácia, Bósnia-Herzegovina e Macedônia, quando aplicados por 72 horas, foram capazes de reduzir a proliferação de células HeLa (BARBARIĆ et al., 2011). Ainda, observou-se redução da proliferação de células HeLa tratadas com extrato hidroalcoólico de própolis advindo do estado de Sergipe (FROZZA et al., 2013). O potencial antitumoral de vários própolis também tem sido comprovado. Em modelo de melanoma murino, houve redução do crescimento e volume tumoral, bem como diminuição da formação de estruturas vasculares ao redor da massa tumoral em camundongos tratados com extrato etanólico de própolis algeriano antes e após a inoculação do tumor (grupos de tratamento preventivo e curativo, respectivamente) (BENGUEDOUAR et al., 2016). O extrato hidroalcoólico de própolis proveniente do interior de Sergipe, quando administrado nas concentrações de 50 e 100 mg/kg, retardou a progressão de lesões pré-cancerosas em modelo de indução de carcinoma oral escamoso em camundongos, além de ter retardado em três semanas a detecção clínica de tumores na submucosa labial (RIBEIRO et al., 2015). Por fim, o tratamento de ratos com extrato etanólico de própolis brasileiro via ração por 32 semanas resultou na redução do número de tumores de câncer de cólon por animal, bem como na regulação negativa da expressão da NOS2, NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ , o que sugere a correlação entre o efeito anti-inflamatório do extrato e a redução do tamanho e multiplicidade tumoral nos ratos tratados (DOI et al., 2017).

Em função das propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante do própolis em tecidos epiteliais, pesquisas clínicas relacionadas ao uso de própolis em pacientes com câncer, concentram-se em verificar se o própolis é capaz de minimizar os efeitos adversos provenientes de regimes quimioterápicos ou esquemas de radiação ionizante, em particular a mucosite oral (SEPÚLVEDA et al., 2019). Um ensaio clínico randomizado unicêntrico e duplo cego realizado no Irã constatou que, dos 20 pacientes com câncer de cabeça e pescoço que utilizaram enxaguante bucal formulado com 30% de extrato de própolis, 65% não desenvolveu mucosite oral em decorrência do uso de diferentes quimioterápicos após 7 dias com o tratamento teste (AKHAVANKARBASSI et al., 2016). Piredda et al. (2017) avaliaram o efeito de um enxaguante bucal com extrato de própolis na prevenção da mucosite oral induzida por quimioterapia em pacientes com câncer de mama ao longo de seis meses, e relataram que, em comparação ao grupo controle (enxaguante bucal com bicarbonato de sódio), nenhum paciente que fez uso do produto com própolis manifestou sintomas graves, ou mesmo moderados, sendo considerado esta, uma promissora terapia complementar.

Há diferentes motivos para a falta de investigação clínica de produtos apícolas, tais como os casos descritos de reações alérgicas aos constituintes e a dificuldade de se obter os principais ativos biológicos presentes nestes em escala industrial (CORNARA et al., 2017). Porém, as evidências levantadas até o momento indicam que o própolis poderia ser um utilizado concomitantemente à quimioterapia aplicada no tratamento para os diversos tipos de tumores , tanto para sensibilizar as células tumorais (BERNARDINO et al., 2018; LIU et al., 2013; PADMAVATHI et al., 2006), quanto para amenizar a ocorrência de efeitos colaterais (PIREDDA et al., 2017; SUZUKI et al., 2002).

### **3 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho visa correlacionar, de maneira preliminar, o efeito citotóxico e antiproliferativo de diferentes extratos de própolis da região metropolitana de Curitiba, Paraná, à atividade anti-inflamatória dos mesmos; além de verificar o efeito tais extratos sobre a ação de antineoplásicos utilizados na clínica para o tratamento de CC.

#### **1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o potencial citotóxico e antiproliferativo dos extratos obtidos do propólis de Piraquara – PR, selecionando o extrato mais promissor;
- Verificar a ação do extrato selecionado sobre o efeito antineoplásico induzido pelo paclitaxel;
- Investigar possíveis interferências do extrato adotado na produção do óxido nítrico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS

O própolis utilizado foi produzido pela espécie de abelha *Apis mellifera* e coletado no Município de Piraquara – PR, na região do Recreio da Serra, sob as seguintes coordenadas geográficas: latitude sul de 25,45° e longitude oeste de 49,02°.

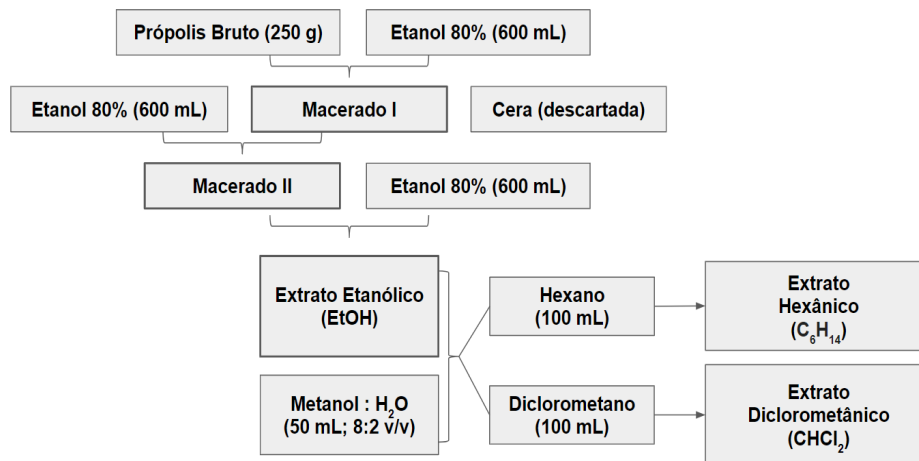
### 4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

O própolis bruto (250 g) foi colocado sob agitação em um frasco contendo 600 mL de etanol a 80% por 48 h. O macerado (a porção líquida) obtido foi removido, e a parte sólida (cera) foi descartada (ver FIGURA 4). O macerado foi novamente misturado com 600 mL de etanol a 80%, seguido de agitação por 24 h. A seguir, repetiu-se a etapa anterior, com a exceção de que o macerado foi deixado em repouso por 24 h. O macerado obtido foi filtrado e submetido a destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo, dando origem ao extrato etanólico (EtOH). Por fim, EtOH foi transferido para um recipiente de vidro e deixado por aproximadamente três dias para evaporação do solvente residual (DE MENDONÇA et al., 2015).

Outros extratos foram obtidos por meio de particionamento líquido-líquido. Desta forma, 10 g de EtOH foram dissolvidos em metanol e água na proporção 8:2 (v/v; volume em 50 mL) e foram adicionados ao sistema, 15 mL de água, seguido de agitação vigorosa e repouso por alguns minutos. A fase metanol/água foi usada como base para o particionamento usando 100 mL dos solventes – adicionados na ordem citada de acordo com o grau de polaridade de cada um – hexano e diclorometano, resultando nos extratos hexânico (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) e diclorometânico (CHCl<sub>2</sub>), respectivamente. O volume de cada extrato foi submetido a destilação sob pressão reduzida em rotaevaporador (DE MENDONÇA et al., 2015).



**FIGURA 3 – ETAPAS SEGUIDAS PARA A OBTENÇÃO DOS DIFERENTES EXTRATOS DE PRÓPOLIS**



O própolis bruto foi macerado três vezes seguidas na presença de etanol a 80%. O Macerado II foi, então, utilizado para extrair a fração etanólica (EtOH). As frações hexânica (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) e diclorometânica (CHCl<sub>2</sub>) foram extraídas a partir da dissolução de EtOH em metanol e água e adição dos solventes hexano e diclorometano, respectivamente na fase metanol/água.

FONTE: O Autor.

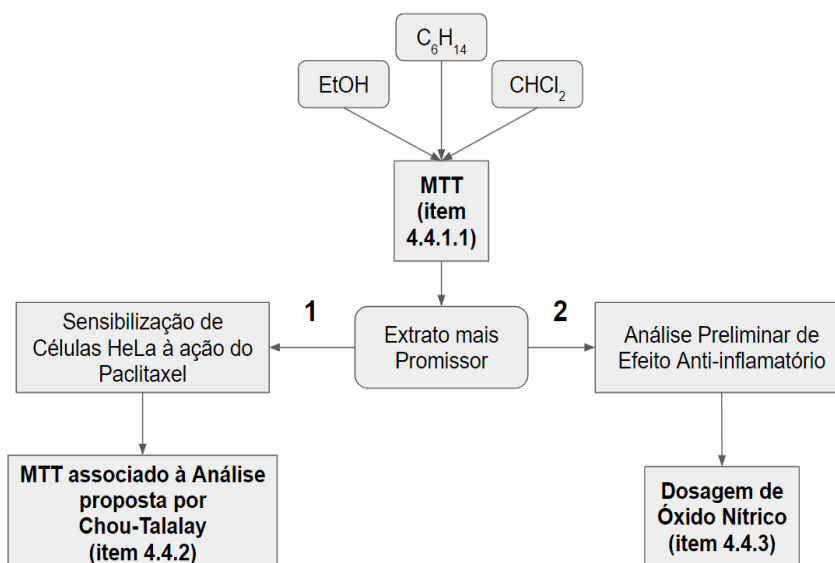
#### 4.3 CULTIVO CELULAR

Células da linhagem HeLa (adenocarcinoma cervical humano HPV18 positivas) e McCoy (fibroblasto murino) foram cultivadas em meio RPMI-1640, e as da linhagem NIH (fibroblasto murino) foram cultivadas em meio DMEM. Ambos os meios para cultivo foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina 10.000 U/mL). A cultura foi mantida em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### 4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Todos os extratos obtidos no item 4.2 foram testados quanto à atividade citotóxica e antiproliferativa pelo ensaio do MTT. A partir dos resultados deste *screening*, o extrato de própolis mais promissor foi selecionado para a execução dos demais ensaios, que compreenderam a análise da sensibilização da ação do paclitaxel e associação do efeito citotóxico/antiproliferativo a sua ação anti-inflamatória (ver FIGURA 4).

**FIGURA 4 – ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL *IN VITRO***



Os três extratos de própolis (etanólico, hexânico e diclorometânico) foram avaliados primeiramente pelo ensaio de MTT. O extrato que exibiu melhor efeito citotóxico/antiproliferativo foi implementado em outros dois experimentos para averiguar a probabilidade da fração sensibilizar células de câncer cervical ao paclitaxel e a possibilidade da ação citotóxica/antiproliferativa do extrato estar associada à modulação de vias inflamatórias moduladas pelo óxido nítrico. EtOH: extrato etanólico de própolis; CHCl<sub>2</sub>: extrato diclorometânico; C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>: extrato hexânico.

FONTE: O Autor.

#### 4.4.1 Avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa do extrato etanólico e frações de própolis de Piraquara – PR

##### 4.4.1.1 Avaliação de citotoxicidade e/ou atividade antiproliferativa pelo sal de tetrazolium (MTT)

A viabilidade mitocondrial das linhagens HeLa, McCoy e NIH foram avaliadas via ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) com adaptações no protocolo de Mosmann (1983).

Em placas de 96 poços, foram semeadas células das linhagens previamente mencionadas, na densidade de 2000 células por poço. As placas foram incubadas em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 horas para adesão celular. Em seguida, foi acrescentado ao meio com o qual as células foram semeadas, 100 µL de meio de cultivo contendo diferentes concentrações dos extratos de própolis (12,5-125 µg/mL) ou veículo (125 µg/mL de DMSO). As placas foram posteriormente incubadas por 72 horas.

Após as 72 horas com o tratamento ou veículo, os poços foram lavados uma vez com tampão fosfato-salina (PBS), para então receberem a solução de MTT (0,5mg/ml, 100 µL/poço), diluída em meio de cultivo. A placa foi incubada em estufa por duas horas e, decorrido este tempo, o reagente foi retirado dos poços, nos quais foram aplicados 100 µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan. As placas foram homogeneizadas e lidas na absorvância de 570 nm em espectrofotômetro. Este teste foi realizado em duplicata.

Os valores de absorvância do controle negativo foram considerados como 100% de redução do sal, o equivalente a 100% de viabilidade celular. Os valores de concentração inibitória mínima (CI<sub>50</sub>) foram determinados a partir do software GraphPad Prisma 8.0.1 (San Diego, EUA).

O índice de seletividade (IS) foi calculado através da fórmula:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ CÉLULA NÃO MALIGNA}}{CI_{50} \text{ CÉLULA MALIGNA}}$$

Na qual CI<sub>50</sub> CÉLULA NÃO MALIGNA representa o valor da concentração inibitória de determinado extrato testado para a linhagem McCoy ou NIH e CI<sub>50</sub> CÉLULA MALIGNA diz ao respeito ao mesmo valor para HeLa. Valores de IS inferiores a 1 foram considerados como indicativo de citotoxicidade não seletiva; valores superiores a 1 foram considerados como indício de citotoxicidade seletiva e valores muito superiores a 1 como citotoxicidade altamente seletiva (BARTMAŃSKA et al., 2018).

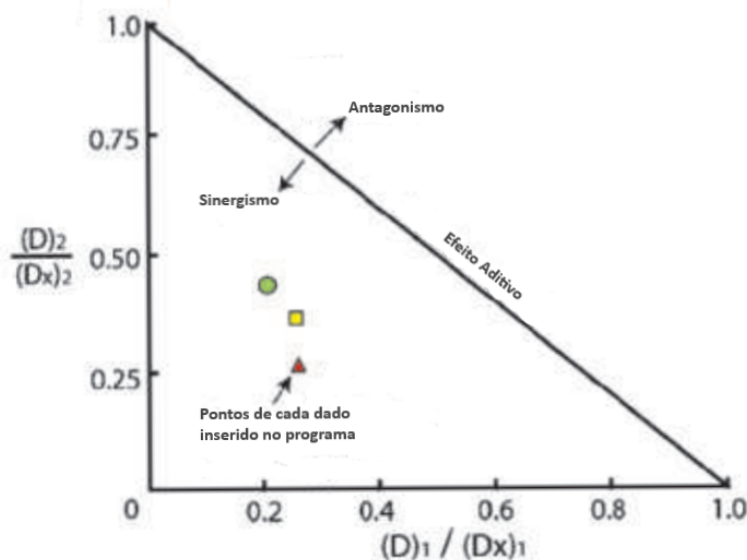
#### 4.4.2 MTT associado ao método de Chou-Talalay para verificação da sensibilização de células HeLa ao Paclitaxel

Células HeLa foram semeadas nas mesmas condições mencionadas no item 4.4.1. Transcorridas 24 horas de incubação para aderirem à placa, as células foram tratadas com veículo (1% de DMSO), somente com o extrato identificado como mais promissor no valor correspondente à sua CI<sub>50</sub>, somente com o quimioterápico paclitaxel (10-300 nM), e com a associação do valor de CI<sub>50</sub> do extrato selecionado e paclitaxel (10-300 nM). A placa foi incubada por 72 horas com o tratamento (NURCAHYANTI; WINK, 2015).

Após este período, realizou-se o ensaio do MTT, conforme descrito anteriormente. Este teste foi realizado em duplicata, e os valores relativos à redução da atividade mitocondrial promovidos pelo própolis, paclitaxel e associação própolis + paclitaxel foram inseridos no software CompuSyn versão 1.0 (ComboSyn, Paragon, NJ, USA) para determinação quantitativa da indução de efeito sinérgico, aditivo ou antagônico, com base no teorema de Chou-Talalay (CHOU, 2010).

O simulador virtual fornece os valores do índice de combinação (do inglês, CI), índice que define se a interação entre os compostos promove um efeito sinérgico ( $CI < 1$ ), aditivo ( $CI = 1$ ) ou antagônico ( $CI > 1$ ), e o índice de redução da droga (do inglês, *drug reduce index*, *DRI*), o qual avalia se a dose de uma das drogas permitiria a redução da outra ( $DRI > 1$ ) ou o oposto ( $DRI < 1$ ). Por fim, o isoblograma confere a representação gráfica da ação conjunta de duas drogas (KRUSE; VIDAL; TREZI, 2006). No caso deste experimento, o mais adequado é o uso do isoblograma normalizado para razão de concentrações não constantes, ou gráfico de Chou-Chou (FIGURA 5).

**FIGURA 5 – ISOBOLOGRAMA NORMALIZADO PARA RAZÃO DE CONCENTRAÇÕES NÃO CONSTANTES**



NOTA:  $(D)_1 / (Dx)_1$ : razão entre dose e dose efetiva média para a Droga 1;  $(D)_2 / (Dx)_2$ : razão entre dose e dose efetiva média para a Droga 2.

FONTE: Adaptado de Chou (2010).

#### 4.4.3 Dosagem de óxido nítrico

Para mensurar, de forma preliminar, o potencial anti-inflamatório do extrato mais promissor, foi feita a dosagem de óxido nítrico (ON) pela reação de Griess (BRYAN; GRISHAM, 2007).

Para a mensuração do óxido nítrico, foi utilizado o sobrenadante de células HeLa semeadas em placa de 6 poços (309.675 células/poço), e tratadas com o  $Cl_{50}$ ,  $Cl_{25}$  e veículo, por 24 horas após a incubação em estufa a  $37^{\circ}C$  e atmosfera de 5% de  $CO_2$ .

A dosagem consistiu na aplicação de 100  $\mu l$  das amostras em poços de placas de 96 poços, aos quais foram adicionados também 100  $\mu l$  do reagente de Griess ( $\alpha$ -naftil etileno diamina e sulfanilamida, proporção 1:1). Para a confecção da curva-padrão, foi utilizado nitrito de sódio ( $NaNO_2$  1 mM, diluição 1:10 com PBS) na faixa de 2,5 a 80  $\mu M$  diluído em meio RPMI 1640, e como "branco", apenas meio RPMI 1640. Por fim, as placas foram lidas por espectrofotômetro em 540 nm (ARAÚJO et al., 2009).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SELEÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS MAIS PROMISSOR

Os resultados de  $CI_{50}$  obtidos a partir do ensaio do MTT para as linhagens HeLa, McCoy e NIH estão expressos na TABELA 1. Para as células HeLa, foi observado que o extrato diclorometânico foi o menos eficaz, seguido dos extratos etanólico e hexânico.

Para as células HeLa, foi observado que o extrato diclorometânico foi o menos eficaz, seguido dos extratos etanólico e hexânico.

Para a linhagem NIH, o extrato menos efetivo foi o etanólico, seguido dos extratos diclorometânico e hexânico.

Por fim, em células McCoy, todos os extratos avaliados induziram citotoxicidade, bem como inibiram a proliferação celular de maneira semelhante, não se observando diferença estatística nos  $CI_{50}$  obtidos.

**TABELA 1** – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E ÍNDICE DE SELETIVIDADE PARA LINHAGENS TRATADAS COM EXTRATOS DE PRÓPOLIS

LINHAGEM	HeLa	NIH		McCoy	
EXTRATO	$CI_{50}$	$CI_{50}$	IS	$CI_{50}$	IS
<b>EtOH</b>	120,8 ± 0,2	103,24 ± 3,8	0,85	73,38 ± 12,22	0,6
<b>CHCl<sub>2</sub></b>	>125	86,18 ± 2,05	IND	58,78 ± 5,05	IND
<b>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></b>	79,09 ± 1,55	67,83 ± 0,94	0,6	66,24 ± 3,55	0,83

NOTA:  $CI_{50}$ : concentração inibitória mínima, expressa em  $\mu\text{g/mL} \pm$  desvio padrão; IS: índice de seletividade, calculado pela razão entre a  $CI_{50}$  da linhagem normal – McCoy ou NIH – e a  $CI_{50}$  da linhagem tumoral; IND: indeterminado; EtOH: extrato etanólico de própolis; CHCl<sub>2</sub>: extrato diclorometânico; C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>: extrato hexânico.

FONTE: O Autor.

Uma das características desejáveis à produtos voltados à terapia do câncer é a baixa toxicidade sistêmica. Neste sentido, estudos *in vitro* conseguem sugerir a capacidade de um composto em induzir citotoxicidade em células tumorais e, simultaneamente, de provocar o mínimo de danos às células não cancerosas, através da determinação do índice de seletividade (IS) (SANTIAGO-VÁZQUEZ et al., 2016).

O cálculo do índice de seletividade mostrou que nenhum dos extratos atingiu um índice igual ou superior a 1, isto é, não apresentaram efeito seletivo, já que a concentração inibitória mínima determinada para as células normais foi superior a determinada para as células neoplásicas.

Um estudo *in vitro* realizado em Portugal (CALHELHA et al., 2014), observou que extratos etanólicos de própolis de diversas localidades do país não foram seletivos para células HeLa em comparação com células de cultura primária de fígado suíno. Entretanto, a maioria das pesquisas realizadas com células humanas, aponta que o própolis exerce efeito citotóxico seletivo, quando compara-se sua ação em células tumorais e normais (FRIÓN-HERRERA et al., 2013; MOUSE et al., 2012; TEERASRIPREECHA et al., 2012; FROZZA et al., 2013, SOUZA et al., 2018).

Assim, o que possivelmente interferiu na seletividade dos extratos foi a utilização de linhagens normais não humanas e não pertencentes ao mesmo órgão/tecido de origem que as células tumorais.

## 5.2 SENSIBILIZAÇÃO DA AÇÃO DO PACLITAXEL SOBRE CÉLULAS HELA

A TABELA 2 aborda os valores de CI para cada concentração de paclitaxel associada a  $CI_{50}$  do extrato hexânico, junto ao DRI para cada composto. Já a, FIGURA 1 trata-se do isoblograma normalizado, utilizado para representar a interação entre o  $CI_{50}$  do própolis e o paclitaxel.

**TABELA 2** – ANÁLISE QUANTO AO TIPO DE EFEITO OBSERVADO PELA COMBINAÇÃO ENTRE PACLITAXEL E  $CI_{50}$  DO EXTRATO HEXÂNICO

Concentração de Paclitaxel (nM)	CI	DRI
10	1,18566	11,3715
25	1,10483	6,15861
50	1,16356	3,52790
75	1,31251	2,33250
100	1,36758	1,91312
125	1,48724	1,54628
150	1,54695	1,36757
200	1,70874	1,09008
300	1,51323	1,13493

NOTA: CI: índice de combinação, fornecido pelo *software* CompuSyn. DRI: índice de redução da droga, fornecido pelo *software* CompuSyn.

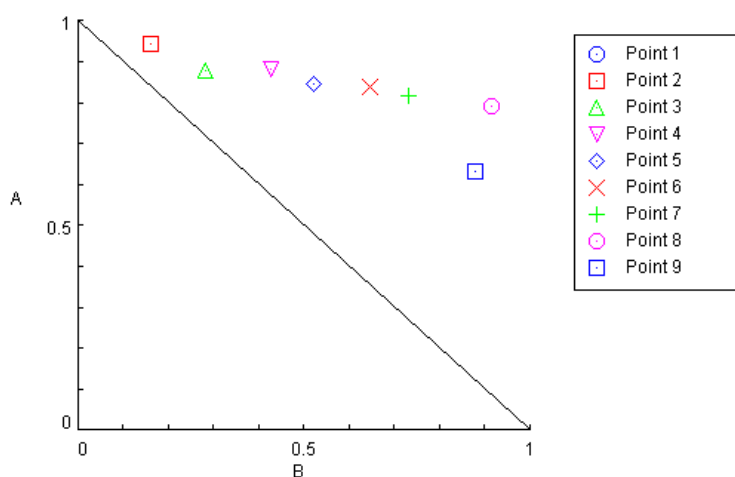
FONTE: O Autor.

É possível perceber que, em todas as concentrações aplicadas de paclitaxel, o índice de combinação do quimioterápico e o extrato selecionado foi superior a 1, sugerindo que a interação que ocorreu entre o própolis e o paclitaxel foi o antagonismo, isto é, o extrato de própolis reduziu parte do efeito terapêutico exercido pelo antineoplásico (TABELA 2).

Os valores de DRI diminuíram juntamente com o aumento da concentração de paclitaxel, mostrando que o efeito predominante observado inicialmente era do extrato hexânico, e que a associação do mesmo ao paclitaxel não foi capaz de reduzir a concentração do quimioterápico a ser aplicada para observar-se a mesma indução de efeito (TABELA 2).

Por fim, a análise do isoblograma normalizado confirma que a associação entre paclitaxel e o própolis foi antagonônica (FIGURA 6).

**FIGURA 6** – ISOBOLOGRAMA NORMALIZADO DA COMBINAÇÃO ENTRE PACLITAXEL E  $CI_{50}$  DO EXTRATO HEXÂNICO



Os pontos evidenciam que a combinação e o extrato  $C_6H_{14}$  (eixo A) e paclitaxel (eixo B) apresenta efeito antagonônico. O ponto 1 está oculto no gráfico em função da forte relação antagonista constatada pelos cálculos do simulador virtual.

FONTE: O Autor.

Em suma, os dados obtidos demonstram que o paclitaxel e o extrato hexânico são mais eficientes quando utilizados separadamente, não sendo o própolis capaz de sensibilizar células HeLa a ação do paclitaxel. Dessa forma,

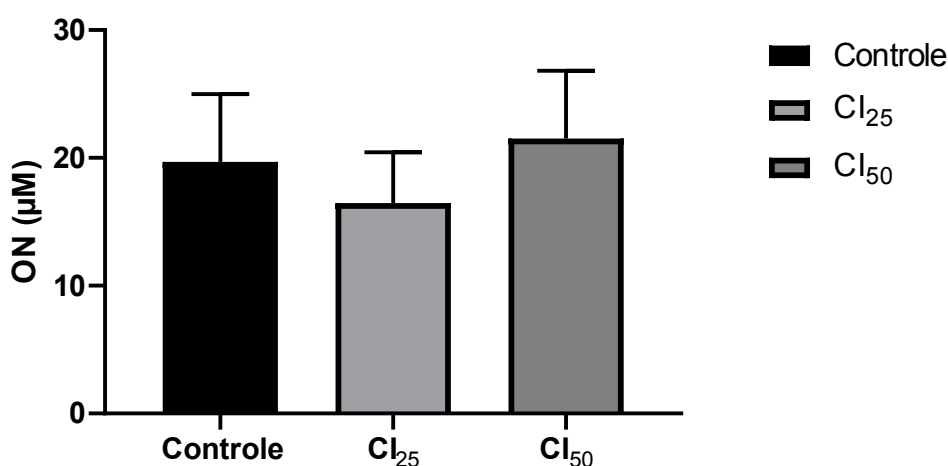


sugere-se que o extrato C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> não é promissor para ser utilizado como coadjuvante ao paclitaxel para o tratamento de carcinoma cervical.

### 5.3 CORRELAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO À CITOTOXICIDADE DO EXTRATO C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>

A concentração de ON determinada no sobrenadante de células HeLa tratadas com o extrato hexânico está apresentada na FIGURA 8.

**FIGURA 7** – CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PARA CÉLULAS HeLa TRATADAS COM C<sub>I25</sub> E C<sub>I50</sub> DO EXTRATO C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>



NOTA: Controle: células tratadas somente com meio de cultivo (RPMI-1640); C<sub>I25</sub>: células tratadas com a concentração inibitória mínima 25%; C<sub>I50</sub>: células tratadas com a concentração inibitória mínima 50%.

FONTE: O Autor.

Os dados obtidos mostram que o extrato hexânico, em nenhuma das concentrações testadas, foi capaz de reduzir significativamente os níveis de ON, sugerindo que o efeito citotóxico/antiproliferativo induzido por C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> em células HeLa não está associado a interferências em vias inflamatórias acionadas por esse mediador. Porém, uma vez que existem outras vias que interligam inflamação e câncer, este resultado não exclui a possibilidade do extrato em questão regular vias de sinalização inflamatórias atuantes na tumorigênese, tais como as mediadas pelo NF- $\kappa$ B, COX-2, dentre outras.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através da execução desse trabalho pode-se concluir que:

- Os extratos de própolis testados apresentaram efeito citotóxico e/ou antiproliferativo na linhagem tumoral e células normais avaliadas;
- O extrato C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> não sensibilizou as células HeLa ao efeito do paclitaxel, uma vez que se observou que o tipo de interação entre estes foi o antagonismo;
- A citotoxicidade e/ou efeito antiproliferativo do extrato hexânico aparenta não estar vinculada a inibição de mecanismos inflamatórios mediados pelo óxido nítrico.

As próximas etapas deste estudo consistem na avaliação do potencial antimigratório, anti-invasivo e investigação do tipo de morte celular induzida pelo extrato hexânico. Também pretende-se avaliar se o extrato é capaz de modular os níveis de COX-2.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, P. HPV infection: Pathogenesis and Detection. In: MEHTA, S.; SINGLA, A. **Preventive Oncology for the Gynecologist**. Springer Nature Singapore Pte Ltd., p. 101-115, 2019.
- AKHAVANKARBASSI, M. H.; YAZDI, M. F.; AHADIAN, H., SADRABAD, M. J. Randomized DoubleBlind PlaceboControlled Trial of Propolis for Oral Mucositis in Patients Receiving Chemotherapy for Head and Neck Cancer. **APJCP**, v. 17, n. 7, p. 3611-3614, jul. 2016.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; DUTRA, R. D.; COSTA, G. C.; et al. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 580–587, abr./out. 2009.
- BANG, D.; WILSON, W.; RYAN, M.; YEH, J. J.; BALDWIN, A. S. GSK-3 $\alpha$  promotes oncogenic KRAS function in pancreatic cancer via TAK1-TAB stabilization and regulation of noncanonical NF- $\kappa$ B. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 6, p. 690–703, abr./jun. 2013.
- BARBARIĆ, M.; MIŠKOVIĆ, K.; BOJIĆ, M.; LONČAR, M. B.; SMOLČIĆ-BUBALO, A.; DEBELJAK, Z.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 5, p. 772-778, jun. 2011.
- BARBUTI, A. M.; CHEN, Z.-S. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy. **Cancers**, v. 7, n. 4, p. 2360-2371, dez. 2015.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, ago. 2015.
- BARTMAŃSKA, A.; TRONINA, T.; POPŁOŃSKI, J.; MILCZAREK, M.; FILIP-PSURSKA, B.; WIETRZYK, J. Highly Cancer Selective Antiproliferative Activity of Natural Prenylated Flavonoids. **Molecules**, v. 23, n. 2922, p. 1-14 nov. 2018
- BASU, P.; MEHEUS, F.; CHAMI, Y. HARIPRASAD, R.; ZHAO, F.; SANKARANARAYANAN, R. Management algorithms for cervical cancer screening and precancer treatment for resource limited settings. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 138, supl. 1, p. 26-32, jul. 2017.
- BENGUEDOUAR, L.; LAHOUEL, M.; GANGLOFF, S. C.; DURLACH, A.; GRANGE, F.; BERNARD, P.; ANTONICELLI, F. Ethanolic Extract of Algerian Propolis and Galangin Decreased Murine Melanoma T. **Anticancer Agents Med Chem.**, v. 16, n. 9, p. 1172-1183, 2016.
- BENTIVEGNA, E.; GOUY, S.; MAULARD, A.; CHARGARI, C.; LEARY, A.;

MORICE, P. Oncological outcomes after fertility-sparing surgery for cervical cancer: a systematic review. **Lancet Oncology**, v. 17, n. 6, p. 240-253, jun. 2016.

BERNARDINO, P. N.; BERSANO, P. R. O.; LIMA NETO, J. F.; SFORCIN, J. M. Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 268–274, ago. 2018.

BIJNSDORP, I. V.; GIOVANNETTI, E.; PETERS, G. J. Analysis of drug interactions. In: CREE, I. A. (Ed. 2) **Cancer Cell Culture: Methods in Molecular Biology**. Suíça: Springer Nature, v. 731, 2011, p. 421-434.

BHATLA, N.; AOKI, D.; SHARMA, D. N.; SANKARANARAYANAN, R. Cancer of the cervix uteri. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 143, supl. 2, p. 22-36, dez. 2018.

BONAMIGO, T.; CAMPOS, J. F.; OLIVEIRA, A. S.; et al. Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–19, abr./set. 2017.

BOZZATTI, B.; RIBOLI, E.; MANTOVANI, A. Aging, inflammation and cancer. **Seminars in Immunology**, v. 40, p. 74-82, out. 2018.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de colo de útero**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>>. Acesso em: 6 jul. 2019.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Números de câncer**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 9 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **HPV: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hpv>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. **Free Radic Biol Med.**, v. 43, n. 5, p. 645–657, 2007.

CAI, T.; DI VICO, T.; DURANTE, J.; TOGNARELLI, A.; BARTOLETTI, R. Human papillomavirus and genitourinary cancers: a narrative review. **Minerva Urologica e Nefrologica**, v. 70, n. 6, p. 579-587, dez. 2018.

CALHELHA, R. C.; FALCÃO, S.; QUEIROZ, M. J.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. Cytotoxicity of Portuguese propolis: the proximity of the in vitro doses for tumor and normal cell lines. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, jun. 2014.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern

medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. SUPPL. 1, p. 1–6, nov. 2002.

CASTLE, P. E.; MUROKORA, D.; PEREZ, C.; ALVAREZ, M.; QUEK, S. C.; CAMPBELL, C. Treatment of cervical intraepithelial lesions. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 138, supl. 1, p. 20-25, jul. 2017.

CHEN, H.; LIJUAN, J.; XIUZHEN, L. ZHONG, J. Correlation between the rs7101 and rs1063169 polymorphisms in the *FOS* noncoding region and susceptibility to and prognosis of colorectal cancer. **Medicine**, v. 98, n. 26, p. 1-8, jun. 2019.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440-446, jan. 2010.

COHEN, P. A.; JHINGRAN, A.; OAKNIN, A.; DENNY, L. Cervical cancer. **The Lancet**, v. 393, p. 169-182, jan. 2019.

CORNARA, L.; BIAGI, M.; XIAO, J.; BURLANDO, B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 412, p. 1-20, jun. 2017.

COSTA, M., MATEUS, T. L.; ROCHA, H. Compostos bioativos em alimentos de origem animal. **TecnoAlimentar**, v. 6, p. 34-37, jan. 2016.

CROWN, J.; O'LEARY, M. The taxanes: an update. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1176-1178, abr. 2000.

DADAR, M.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K.; PRASAD, M.; KHANDIA, R.; HASSAN, S.; MUNJAL, A.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; KUMAR, D.; IQBAL, H. M. N.; CHAICUMPA, W. Advances in Designing and Developing Vaccines, Drugs and Therapeutic Approaches to Counter Human Papilloma Virus. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2478, p. 1-32, nov. 2018.

DANG, C. V. *MYC* on the Path of Cancer. **Cell**, v. 149, p. 22-35, mar. 2012.

DA SILVA, R. G. M.; DO NASCIMENTO, V. F.; DOS SANTOS, P. O. F.; FERREIRA, M. Z. J. Teste de Papanicolau: reconhecimento e conhecimento de acadêmicas de enfermagem. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 9, n. 1, p. 81-86, jan./mar. 2019.

DE FOUW, M.; OOSTING, R. M.; RUTGRINK, A.; DEKKERS, O. M.; PETERS, A. A. W.; BELTMAN, J. J. A systematic review and meta-analysis of thermal coagulation compared with cryotherapy to treat precancerous cervical lesions in low- and middle-income countries. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 146, n. 1, jul. 2019.

DE MENDONÇA, I.G.C.; PORTO, I. C.C.M.; DO NASCIMENTO, T.G.; DE SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J. M. S.; ARRUDA, R.E. S.; MOUSINHO, K.C.; DOS SANTOS, A. F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F. S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 357, 2015.

DOI, K.; FUJIOKA, M.; SOKUZA, Y.; OHNISHI, M.; GI, M.; TAKESHITA, M.; KUMADA, K.; KAKEHASHI, A.; WANIBUCHI, H. Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis. **In Vivo**, v. 31, n. 2, p. 187-198, mar./abr. 2017.

DUEÑAS-GONZÁLEZ, A.; CAMPBELL, S. Global strategies for the treatment of early-stage and advanced cervical cancer. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 28, n. 1, p. 11-17, fev. 2016.

ENWERE, E.K.; KORNAGA, E. N.; DEAN, M.; KOULIS, T. A.; PHAN, T.; KALANTARIAN, M.; KÖBEL, M.; GHATAGE, P.; MAGLIOCCO, A. M.; LEES-MILLER, S. P.; DOLL, C. M. Expression of PD-L1 and presence of CD8-positive T cells in pre-treatment specimens of locally advanced cervical cancer. **Modern pathology**, v. 30, n. 4, p. 577-586, abr. 2017.

ERIKSSON, D.; STIGBRAND, T. Radiation-induced cell death mechanisms. **Tumor Biology**, v. 31, n. 4, p. 363–372, mai./ago. 2010.

EUA. Genentech, Inc. **About Avastin: Proposed Mechanism of Action**. Disponível em: <<https://www.avastin.com/hcp/cc/proposed-moa.html>>. Acesso em: 26 ago. 2019.

FALCETTA, F. S.; MEDEIROS, L. R. F.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, P. R.; STEIN, A. T.; ROSA, D. D. Adjuvant platinum-based chemotherapy for early stage cervical cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, n. 6, p 1-48, nov. 2016.

FARIDI, R.; ZAHRA, A., KHAN, K., IDREES, M. Oncogenic potencial of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. **Virology Journal**, v., n, 269, p. 1-8, jun., 2011.

FIRKINS, R.; EISFELD, H.; KEINKI, C.; BUENTZEL, J.; HOCHHAUS, A.; SCHMIDT, T.; Huebner, J. The use of complementary and alternative medicine by patients in routine care and the risk of interactions. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 144, n. 3, p. 551-557, mar. 2018.

FONSECA-MOUTINHO, J. A. Smoking and Cervical Cancer. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2011, p. 1-6, abr./mai. 2011.

FRANCHIN, M.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; NANI, B. D.; DA CUNHA, M. G.; CÓLON, D. F.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The use of brazilian propolis for discovery of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49-55, jun. 2018.

FREEDMAN, J.; GRIGGS, J.; DE PADOVA, M. P.; TOSTI, A. What's the "buzz" about propolis? Propolis-induced systemic contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 80, n. 1, p. 1-2, out. 2018.

FRIÓN-HERRERA, Y.; DÍAZ-GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, H.; RUIZ-

FUENTES, J.; MONZOTE-FIDALGO, L.; MORIER-DÍAZ, L.; SETZER, W. N. Cytotoxic Effect of Cuban Propolis Extracts Against Tumor Cells Lines. **AJEONP**, v. 1, n. 1, p. 112-117, ago. 2013.

FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol.**, v. 52, p. 137-142, fev. 2013.

GHEIT, T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n 355, p. 1-22, mai. 2019.

GONZALEZ, H. HAGERLING, C.; WERB, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes & Development**, v. 32, n.19-20, p. 1267–1284, out. 2018.

HAAS, L.; OBENAUF, A. C. Allies or Enemies - The Multifaceted Role of Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2746, p. 1-11, nov. 2019.

HANNAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, mar. 2011.

JOHNSON, D. E.; O'KEEFE, R. A.; GRANDIS, J. R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 15, n. 4, p. 234-248, abr. 2018.

KABAŁA-DZIK, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; KUBINA, R.; et al. Caffeic Acid Versus Caffeic Acid Phenethyl Ester in the Treatment of Breast Cancer MCF-7 Cells: Migration Rate Inhibition. *Integrative cancer therapies*, v. 17, n. 4, p. 1247–1259, jun./ago. 2018.

KASHFI, K.; VANINI, F. Nitric Oxide and Cancer: To Inhibit or To Induce iNOS: That Is the Question?. In: MORBIDELLI, L.; BONAVIDA, B. (Ed. 1). **Therapeutic Application of Nitric Oxide in Cancer and Inflammatory Disorders**. Elsevier Inc., p. 93-111, 2019.

KHATUN, S. F.; KHATUN, S.; HOSSAIN, A. K. M. F.; NAHAR, K. Prolonged use of oral contraceptive pill, a co-factor for the development of cervical cancer. **BSMMU J**, v. 111, p. 222-225, abr./set. 2018.

KOH, W.-J.; ABU-RUSTUM, N. R.; BEAN, S.; BRADLEY, K.; CAMPOS, S. M.; CHO, K. R.; CHON, H. S.; CHU, C.; CLARK, R.; COHN, D.; CRISPENS, M.A.; DAMAST, S.; DORIGO, O.; EIFEL, P. J.; FISHER, C. M.; FREDERICK, P.; GAFFNEY, D. K.; HAN, E.; HUH, W. K.; LURAIN III, J. R.; MARIANI, A.; MUTCH, D.; NAGEL, C.; NEKHLYUDOV, L.; FADER, A. N.; REMMENGAS, S. W.; REYNOLDS, R. K.; TILLMANN, T.; UEDA, S.; WYSE, E.; YASHAR, C. M.; MCMILLIAN, N. R.; SCAVONE, J. L. Cervical Cancer, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, n. 1, p. 64-84, jan. 2019.

KRUSE, N.D.; VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 579-587, jul./set. 2006.

ŁANIEWSKI, P.; BARNES, D.; GOULDER, A.; CUI, H.; ROE, D. J.; CHASE, D. M.; HERBST-KRALOVETZ, M. Linking cervicovaginal immune signatures, HPV and microbiota composition in cervical carcinogenesis in non-Hispanic and Hispanic women. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-13, mai. 2018.

LEMOS JÚNIOR, H. P. DE; LEMOS, A. L. A. DE. Própolis. **Diagn Tratamento**, v. 18, n. 1, p. 24–26, nov. 2012.

LI, H.; WU, X.; CHENG, X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. **J. Gynecol. Oncol.**, v. 27, n. 4, p. 1-20, fev. 2016.

LIMA, M.; ORSI, R. O.; COSTA, G. M.; MALASPINA, O. Brazilian Propolis Production by Africanized Bees (*Apis mellifera*). **Bee World**, v. 92, n. 3, p. 58-68, jul. 2016.

LIU, C. C.; HSU, J. M.; KUO, L. K.; CHUU, C. P. Caffeic acid phenethyl ester as an adjuvant therapy for advanced prostate cancer. **Medical Hypotheses**, v. 80, n. 5, p. 617–619, jan/fev. 2013.

LIU, Y.; WU, L.; TONG, R.; YANG, F.; YIN, L.; LI, M.; YOU, L.; XUE, J.; LU, Y. PD-1/PD-L1 Inhibitors in Cervical Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 65, p. 1-8, fev. 2019.

MACDONALD, M. C.; TIDY, J. A. Can We Be Less Radical with Surgery for Early Cervical Cancer?. **Currently Oncology Reports**, v. 18, n. 16, p. 1-7, fev. 2016.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436-444, jul. 2008.

MENTER, D. G.; DUBOIS, R. N. Prostaglandins in Cancer Cell Adhesion, Migration and Invasion. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. 1-22, out. 2011.

MINION, L. E.; TEWARI, K. S. Cervical cancer - State of the science: From angiogenesis blockade to checkpoint inhibition. **Gynecol. Oncol.**, v. 148, n. 3, p. 609-621, mar. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **GUIA PRÁTICO SOBRE HPV - PERGUNTAS E RESPOSTAS**. Brasília, DF, 30 nov. 2017, p. 1-45. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/dezembro/07/Perguntas-e-respostas-HPV-.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2019.

MOGA, M. A.; DIMIENESCU, O. G.; ARVATESCU, C. A.; MIRONESCU, A.; DRACEA, L.; PLES, L. The Role of Natural Polyphenols in the Prevention and



Treatment of Cervical Cancer - An Overview. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1-32, ago. 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUSE, H. A.; TILAOUI, M.; JAAFARI, A.; M'BAREK, L. A.; ABOUFATIMA, R.; CHAIT, A.; ZYAD, A. Evaluation of the in vitro and in vivo anticancer properties of Moroccan propolis extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 558-567, mai./jun. 2012.

NAKAJIMA, Y.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 1–9, fev. 2009.

NIKOLAITCHOUK, N. **The female tract microbiota** - Composition, relation to innate immune factors, and effects of contraceptives. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Departamento de Doenças Infecciosas/Bacteriologia Clínica, Universidade de Gotemburgo, Gotemburgo, 2009.

NURCAHYANTI, A. D.; WINK M. Cytotoxic potentiation of vinblastine and paclitaxel by L-canavanine in human cervical cancer and hepatocellular carcinoma cells. **Phytomedicine**, v. 22, n. 14, p. 1232-1237, dez.2015.

OLIVEIRA, M. M.; ANDRADE, S. S. C. A.; DE OLIVEIRA, P. P. V.; AZEVEDO E SILVA, G.; DA SILVA, M. M. A.; MALTA, D. C. Cobertura de exame Papanicolaou em mulheres de 25 a 64 anos, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde e o Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, 2013. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 21, p. 1-11, ago. 2018.

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, mar. 2018.

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 - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, n. 3, p. 349–354, mar./jul. 2006.

PIREDDA, M.; FACCHINETTI, G.; BIAGIOLI, V.; et al. Propolis in the prevention of oral mucositis in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: A pilot randomised controlled trial. **European Journal of Cancer Care**, v. 26, n. 6, p. 1–8, jul./ago. 2017.

PÓVOA, V.; FIOR, R. Cancer Immunediting and Hijacking of the Immune System. In: FIOR, R.; ZILHÃO, R. **Molecular and Cell Biology of Cancer - When Cells Break the Rules**. SpringerSwitzerland AG, p. 117-139, 2019.

QIU, H.; LI, J.; LIU, Q.; TANG, M.; WANG, Y. Apatinib, a novel tyrosine kinase inhibitor, suppresses tumor growth in cervical cancer and synergizes with Paclitaxel. **Cell Cycle**, v. 17, n. 10, p. 1235-1244, jul. 2018.

REGALADO PORRAS, G. O. R.; NOGUEDA, J. C.; CHACÓN, A. P. Chemotherapy and molecular therapy in cervical cancer. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 23, n. 6, p. 533-539, nov./dez. 2018.

RIBEIRO, D. R.; ALVES, Â. V.; DOS SANTOS, E. P.; PADILHA, F.F.; GOMES, M. Z.; RABELO, A. S.; CARDOSO, J. C.; MASSARIOLI, A. P.; DE ALENCAR, S. M.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model, **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 117, n. 2, p. 85-95, ago. 2015.

ROY, M.; MUKHERJEE, A.; SARKAR, R.; MUKHERJEE, S.; BISWAS, I. In Search of Natural Remediation for Cervical Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, 2015.

SANTIAGO-VÁZQUEZ, Y.; DAS, U.; VARELA-RAMIREZ, A.; BACA, S. T.; AYALA-MARIN, Y.; LEMA C.; DAS, S.; BARYYAN, A.; DIMMOCK, J. R.; AGUILERA, R. J. Tumor-selective cytotoxicity of a novel pentadiene analogue on human leukemia/ lymphoma cells. **Clinical Cancer Drugs**, v. 3, n. 2, p. 138-146, nov. 2016.

SCHWAB, C. L.; ENGLISH, D. P.; ROQUE, D. M.; SANTIN, A. D. Taxanes: their impact on gynecologic malignancy. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 5, p. 522-535, mai. 2014.

SEPÚLVEDA, C.; NÚÑEZ, O.; TORRES, A. GUZMÁN, L.; WEHINGER, S. Antitumor Activity of Propolis: Recent Advances in Cellular Perspectives, Animal Models and Possible Applications. **Food Reviews International**, v. 35, n. 8, p. 1-27, ago. 2019.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, jul./out. 2010.

SHRIHARI, T. G. Dual role of inflammatory mediators in cancer. **ecancer**, v. 11, n. 721, p. 1-9, fev. 2017.

SMALL, W.; BACON, M. A.; BAJAJ, A.; CHUANG, L. T.; FISHER, B. J.; HARKENRIDER, M. M.; JHINGRAN, A.; KITCHENER, H. C.; MILESHKIN, L. R.; VISWANATHAN, A. N.; GAFFENEY, D. K. Cervical Cancer: A Global Health Crisis. **Cancer**, v. 123, p. 2404-2412, jul. 2017.

SMOLA, S. Immune deviation and cervical carcinogenesis. **Papilloma Research**, v. 7, p. 164-167, mar./abr. 2019.

SOMASUNDARAM, V.; BASUDHAR, D.; BHARADWAJ, G.; NO, J. H.; RIDNOUR, L. A.; CHENG, R. Y. S.; FUJITA, M. Molecular Mechanisms of Nitric

Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 30, n. 8, p. 1-20, mar. 2019.

SOUSA, G. F.; WLODARCZYK, S. R.; MONTEIRO, G. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 50, n. 4, p. 693-701, out./dez. 2014.

SOUZA, E. A.; INOUE, H. T.; FERNANDES JÚNIOR, A.; VEIGA, N.; ORSI, R. O. Influence of seasonality and production method on the antibacterial activity of propolis. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 36, n. 1, p. 49-53, mar. 2014.

SOUZA, R. P.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; DAMKE, G. M. Z. F.; DE-ASSIS CARVALHO, A. R. B.; RATTI, B. A.; DEMBOGURSKI D. S. O.; DA-SILVA, V. R. S.; SILVA, S. O.; DA-SILVA, D. B.; BRUSCHI, M. L.; MARIA-ENGLER, S. S.; CONSOLARO, M.E. L. Artepillin C Induces Selective Oxidative Stress and Inhibits Migration and Invasion in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer Cell Lines. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 18, n. 12, p. 1750-1760, 2018.

SUZUKI, I., HAYASHI, I., TAKAKI, T., GROVEMAN, D. S., FUJIMIYA, Y. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. **Cancer Biother Radiopharm.**, v. 17, n. 5, p. 553-562, out. 2002.

TEERASRIPREECHA, D.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; et al. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 27, mar. 2012.

TEWARI, K. S.; SILL, M. W.; PENSON, R. T.; HUANG, H.; RAMONDETTA, L. M.; LANDRUM, L. M.; OAKNIN, A.; REID, T. J.; LEITAO, M. M.; MICHAEL, H. E.; DISAIA, P. J.; COPELAND, L. J.; CREASMAN, W. T.; STEHMAN, F. B.; BRADY M. F.; BURGER, R. A.; THIGPEN, J. T.; BIRRER, M. J.; WAGGONER, S. E.; MOORE, D. H.; LOOK, K. Y.; KOH, W. J.; MONK B. J. Bevacizumab for advanced cervical cancer: final overall survival and adverse event analysis of a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial (Gynecologic Oncology Group 240). **Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1654-1663, out. 2017.

TOMAO, F.; CORRADO, G.; PECCATORI, F. A.; BOVERI, S.; PRETI, E. P.; COLOMBO, N.; LANDONI, F. Fertility-Sparing Options in Young Women with Cervical Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1-18, jan. 2016.

TOMAO, F.; DI TUCCI, C.; IMPERIALE, L.; BOCCIA, S. M.; MARCHETTI, C.; PALAIA, I.; MUZII, L.; PANICI, P. B. Cervical Cancer: Are There Potential New Targets? An Update on Preclinical and Clinical Results. **Current Drug Targets**, v. 15, n. 12, p. 1107-1120, 2014.

VORDERMARK, D. Radiotherapy for Cervical Cancer. **Oncology Research and Treatment**, v. 39, p. 516-520, set. 2016.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351–360, mai. 2002.

WEST, H. J. Complementary and Alternative Medicine in Cancer Care. **JAMA Oncology**, v. 4, n. 1, p. 139, jan. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

XUE, J.; WANG, Y.; CHEN, C.; ZHU, X.; ZHU, H.; HU, Y. Effects of Th17 cells and IL-17 in the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection. **Cancer Med.**, v. 7, n. 2, p. 297-306, fev. 2018.

YUCE SARI, S.; GULER, O. C.; GULTEKIN, M.; ONAL, H. C.; YILDIZ; E. Adjuvant Small Pelvic Radiotherapy in Patients with Cervical Cancer Having Intermediate Risk Factors Only - Is It Sufficient?. **Oncology Research and Treatment**, v. 40, n. 9, p. 523-527, set. 2017.

ZHU, H.; LUO, H.; ZHANG, W.; SHEN, Z.; HU, X.; ZHU, X. Molecular Mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1885-1895, jun. 2016.