

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA BRANTES

AVALIAÇÃO DO PRÓPOLIS DE ABELHAS *Tetragona clavipes* NA
SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MDA-MB-231 À
CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS

CURITIBA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA BRANTES

AVALIAÇÃO DO PRÓPOLIS DE ABELHAS *Tetragona clavipes* NA
SENSIBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MDA-MB-231 À
CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, no Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra. Karina Bettega Felipe
Coorientadora: Prof.^a Dra. Amanda Rabello Crisma

CURITIBA

2022

Brantes, Bruna

Avaliação do própolis de abelhas *Tetragona clavipes* na sensibilização de células MDA-MB-231 à citotoxicidade induzida por quimioterápicos [recurso eletrônico] / Bruna Brantes – Curitiba, 2022. 1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Profa. Dra. Karina Bettega Felipe
Coorientador: Profa. Dra. Amanda Rabello Crisma

1. Própole - Farmacologia. 2. Fluoruracila. 3. Abelhas. I. Felipe, Karina Bettega. II. Crisma, Amanda Rabello. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA BRANTES** intitulada: **Avaliação do própolis de abelhas *Tetragona clavipes* na sensibilização de células MDA-MB-231 à citotoxicidade induzida por quimioterápicos**, sob orientação da Profa. Dra. KARINA BETTEGA FELIPE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-graduação.

CURITIBA, 29 de agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

30/08/2022 07:57:21.0

KARINA BETTEGA FELIPE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/08/2022 15:49:50.0

ALMERIANE MARIA WEFFORT SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/08/2022 15:55:04.0

ROZANGELA CURI PEDROSA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 218665
Para autenticar este documento/assinatura, acesse
<https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 218665

Dedico este trabalho às minhas rochas: Lilian, Vinícius e Filipe

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me dar forças ao longo de toda essa jornada.

À minha mãe **Lilian**, por me apoiar, incentivar e vibrar com todas as minhas conquistas dentro e fora da Universidade.

Ao meu irmão **Vinícius**, por ser meu porto-seguro, pelos conselhos dados e por sempre me fazer rir com suas piadas infames.

Ao meu namorado **Filipe**, pelo amor, dedicação e, principalmente, pela paciência e compreensão com a minha rotina laboratorial.

Aos meus bichinhos de estimação **Maggie, Leif, Maia, Tico e Liz** que mesmo sem entender, aliviavam toda a minha tensão quando tudo parecia dar errado.

À minha amiga **Vanessa**, pela amizade, pelo auxílio com os experimentos e por todos os conselhos dados.

Aos amigos que me acompanharam nessa jornada torcendo por mim, em especial à **Isabelle, Mayara e Gustavo**.

Aos colegas do Laboratório **FiSiCel**, pelo conhecimento compartilhado e pelas risadas entre experimentos.

Às Professoras **Karina e Amanda**, por me orientarem, pela dedicação e por todo conhecimento transmitido dentro e fora do laboratório.

Ao Professor **Wesley**, por permitir a utilização do seu laboratório para a execução de alguns experimentos.

Aos técnicos da **Central Analítica**, pela paciência e confiança, e ao **CTAF** pelo apoio técnico e pelo uso do microscópio de fluorescência.

À **UFPR**, pela oportunidade em participar de um programa de pós-graduação público e conceituado.

À **CAPES**, pela bolsa concedida.

Enfim, é com um imenso carinho e muito amor que agradeço e dedico a todos vocês esta conquista.

**“Foi o tempo que dedicaste à tua
rosa que à fez tão importante”.**
Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente em mulheres, bem como a responsável pela maior mortalidade associada ao câncer no sexo feminino. Dentre os vários tipos moleculares de câncer de mama, destacam-se tumores triplo negativos, com o pior prognóstico e a menor sobrevida global, visto que pacientes portadores desse tipo de tumor frequentemente apresentam metástases, quimiorresistência e recidiva da doença. Isso evidencia a necessidade de se buscar novas abordagens terapêuticas, mais efetivas e seletivas para o tratamento dessa doença. Nesse sentido, merece destaque o própolis, o qual vem sendo amplamente investigado devido ao seu potencial citotóxico e antitumoral. Este trabalho visa avaliar o própolis da abelha *Tetragona clavipes* (BORÁ) como agente capaz de sensibilizar células de carcinoma mamário à ação de doxorrubicina (DOXO), paclitaxel (PACLI) e 5-fluorouracil (5-FU). A seleção da linhagem tumoral MDA-MB-231 para a execução deste trabalho baseou-se em resultados obtidos a partir do *screening* realizado por meio do ensaio do MTT, que demonstrou que BORÁ apresentou citotoxicidade significativa em um painel de linhagens tumorais, sobretudo na linhagem de câncer de mama triplo negativa. Ainda, os resultados obtidos evidenciaram que tal citotoxicidade foi seletiva, comparando-se os efeitos induzidos por BORÁ nas células MDA-MB-231 e na linhagem não tumoral L929. Em relação a avaliação da capacidade de BORÁ sensibilizar seletivamente células MDA-MB-231, a ação desses três quimioterápicos, resultados promissores foram obtidos com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), sendo o esquema de pré-tratamento, o mais efetivo. O ensaio de incorporação de iodeto de propídeo/laranja de acridina mostrou que a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), aplicada na forma de pré-tratamento, induziu morte celular por mecanismos que atuam na ruptura/desorganização da membrana celular, enquanto o ensaio do *wound healing* mostrou que tal combinação reduziu a migração de células MDA-MB-231, sugerindo que a mesma apresenta potencial antimetastático. Já o ensaio clonogênico demonstrou que as associações 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) e 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) induziram efeito anticlonogênico seletivo, estando tal efeito associado ao potencial antiproliferativo das combinações, bem como ao fato de reduzirem a capacidade de adesão celular. Por fim, o ensaio do CPD (*cumulative population doubling*) mostrou que a longo prazo, o tratamento mais promissor foi a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), o qual deve ser estendido até o 24^o dia, intervalo de tempo no qual a associação retardou de forma seletiva e significativa, o crescimento celular, ao evitar a recuperação total da taxa de proliferação de células MDA-MB-231. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que o pré-tratamento de células MDA-MB-231 com BORÁ potencializa a ação citotóxica induzida por 5-FU a curto e longo prazo.

Palavras-chave: própolis; antitumoral; citotoxicidade; 5-fluorouracil; *Tetragona clavipes*, células MDA-MB-231.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasm in women, and responsible for the highest cancer-associated mortality in females. Among the various molecular types of breast cancer, triple negative tumors stand out, which have a worse prognosis and lower overall survival, since patients with this type of tumor often have metastases, chemoresistance, and disease recurrence. This highlights the need to search for new, more effective, and selective therapeutic approaches for the treatment of this disease. In this way, propolis deserves to be highlighted, it has been widely investigated due to its cytotoxic and antitumor potential. Therefore, this work aims to evaluate whether *Tetragona clavipes* bee propolis (BORÁ) is capable of sensitizing mammary carcinoma cells to the action of doxorubicin (DOXO), paclitaxel (PACLI), and 5-fluorouracil (5-FU). The selection of the MDA-MB-231 tumor line for this work was based on the results obtained from a screening carried out using the MTT assay, which showed that BORÁ presented significant cytotoxicity in a panel of tumor lines, especially in the triple-negative breast cancer. Furthermore, the results obtained showed that its cytotoxicity was selective, comparing the effects induced by BORÁ in MDA-MB-231 cells and the non-tumor lineage L929. Regarding the evaluation of the ability of BORÁ to selectively sensitize MDA-MB-231 cells to the action of the three chemotherapy agents mentioned, promising results were obtained with the associations 5-FU (0.125 – 4 μM) + BORÁ (22.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$), being the most effective pretreatment regimen. The propidium iodide/acridine orange incorporation assay showed that the association 5-FU (1 μM) + BORÁ (22.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$), as a pretreatment induced cell death by mechanisms that act on rupture/disorganization of the cell membrane. The wound healing assay showed that this combination reduced the migration of MDA-MB-231 cells, suggesting that it has antimetastatic potential. The clonogenic assay showed that the associations between 5-FU (1 μM) + BORÁ (22.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 5-FU (2 μM) + BORÁ (22.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced a selective anticlonogenic effect, being this effect associated with the potential antiproliferative effect of the combinations, as well as the fact that they reduce the cell adhesion capacity. Finally, the CPD (*cumulative population doublings*) trial showed that in the long term, the most promising treatment was the association 5-FU (1 μM) + BORÁ (22.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$), which should only be extended until the 24th day, an interval of time in which the association selectively and significantly delayed cell growth, preventing full recovery of the proliferation rate of MDA-MB-231 cells. Thus, the results obtained suggest that MDA-MB-231 cells pretreated with BORÁ potentiate the cytotoxic action induced by 5-FU in short and long term.

Keywords: propolis; antitumor; cytotoxicity; 5-fluorouracil; *Tetragona clavipes*, MDA-MB-231 cells.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Hallmarks of cancer</i>	24
FIGURA 2 - Ativação da apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca	32
FIGURA 3 - Vias de sinalização molecular da necroptose.	35
FIGURA 4 - Esquema do pré- tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com própolis de abelha Borá para verificação de efeito induzido a curto prazo e a longo prazo.	51
FIGURA 5 - Esquema do co- tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com própolis de abelha Borá para verificação de efeito induzido a curto prazo e a longo prazo.	52
FIGURA 6 - Esquema do pós- tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com própolis de abelha Borá para verificação de efeito induzido a curto prazo e a longo prazo.	53
FIGURA 7 - Efeitos do tratamento com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	66
FIGURA 8 - Efeitos do tratamento com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	67
FIGURA 9 - Efeitos do tratamento com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	69
FIGURA 10 - Efeitos do tratamento com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de co-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929	70
FIGURA 11 - Efeitos do tratamento com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de co-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	71
FIGURA 12 - Efeitos do tratamento com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de co-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	72
FIGURA 13 - Efeitos do tratamento com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pós-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	73
FIGURA 14 - Efeitos do tratamento com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pós-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	74
FIGURA 15 - Efeitos do tratamento com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pós-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.	75
FIGURA 16 - Avaliação preliminar do tipo de morte induzida por Borá, 5-FU e sua associação, baseado na indução de alterações na permeabilidade e integridade de membrana.	78
FIGURA 17 - Avaliação da inibição da migração celular durante tratamento com Borá, 5-FU e suas associações.	82

FIGURA 18 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.	86
FIGURA 19 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.	88
FIGURA 20 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento. .	90
FIGURA 21 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento. .	92
FIGURA 22 - Avaliação da cinética de crescimento celular, após o tratamento com associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento. .	96
FIGURA 23 - Avaliação da cinética de crescimento celular, após o tratamento com associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento. .	97
FIGURA 24 - Efeito seletivo a longo prazo exercido pela associação 5-FU + BORÁ caracterizado pela determinação dos seguintes parâmetros do CPD: RendCPD, RPR e RTCT.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Tipos de morte celular regulada	36
TABELA 2 - Tipo de morte celular e alvos moleculares de própolis de diferentes espécies de abelhas em várias linhagens de câncer.....	41
TABELA 3 - Efeito <i>in vitro</i> de própolis e seus compostos isolados, no ciclo celular de linhagens tumorais.	45
TABELA 4 - Efeito <i>in vivo</i> adjuvante e/ou paliativo de própolis e compostos isolados dos mesmos em modelos experimentais para o estudo do câncer.....	47
TABELA 5 - Citotoxicidade induzida pelo extrato etanólico da abelha Borá.....	60
TABELA 6 - Valores dos parâmetros do CPD: RendCPD, RPR e RTCT.....	99

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Características e prognóstico dos subtipos moleculares do câncer de mama.	27
--	----

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2.OBJETIVOS	19
2.1.OBJETIVO GERAL	19
2.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3.REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1.CÂNCER- ASPECTOS GERAIS	20
3.2.CÂNCER DE MAMA	25
3.3.MECANISMOS DE MORTE CELULAR	30
3.3.1. Morte celular acidental	31
3.3.2.Morte celular programada	31
3.3.2.1Apoptose extrínseca e apoptose intrínseca	31
3.3.2.2 Necrose	34
3.3.2.3.Outros tipos de morte celular programada	36
3.4.METÁSTASE	37
3.5. <i>Tetragona clavipes</i>	38
3.6.PRÓPOLIS	39
3.6.1.Principais mecanismos relacionados a ação antitumoral de própolis e seus compostos	40
3.6.1.1.Mecanismos de morte celular	41
3.6.1.2.Interferências na sinalização oncogênica	42
3.6.1.3.Mecanismos de regulação do ciclo celular	43
3.6.1.4.Migração, invasão e angiogênese	45
3.6.2.Própolis como adjuvante em terapias	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1.COLETA E OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DA ABELHA <i>Tetragona clavipes</i>	49
4.2.CULTURA E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES	49
4.3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL ADOTADA PARA O ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE ABELHA BORÁ À QUIMIOTERÁPICOS	50
4.4.AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	54
4.5.ENSAIO DE INTEGRIDADE E PERMEABILIDADE DE MEMBRANA	56
4.6.ENSAIO DE MIGRAÇÃO (<i>Wound Healing</i>)	56

4.7. ENSAIO CLONOGÊNICO	57
4.8. ENSAIO CPD (<i>Cumulative Population Doubling</i>)	58
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO DE BORÁ.....	60
5.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ A QUIMIOTERÁPICOS.....	63
5.3. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO TIPO DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ AO 5-FLUOROURACIL.....	78
5.4. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ AO 5-FLUOROURACIL.....	80
5.5. AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO INDUZIDO PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ AO 5-FLUOROURACIL SOBRE CÉLULAS MDA-MB- 231	84
6. CONCLUSÕES	106
7. PERSPECTIVAS	107
8. REFERENCIAS	108

1. INTRODUÇÃO

As abelhas surgiram na Terra há mais de 100 milhões de anos (SILVA NETO, 2016), e, desde então, apresentam grande importância ecológica, econômica e de segurança alimentar (BEZERRA *et al.*, 2020).

As abelhas, além de exercerem um papel fundamental na agricultura com a polinização de angiospermas, podem ser criadas para a produção de mel, cera e própolis (KOFFLER *et al.*, 2015). A composição química de tais produtos é variável e está relacionada com alguns fatores, tais como: origem botânica, origem geográfica, espécie da abelha e a estação do ano em questão, apresentando assim, quantidades variáveis de compostos fenólicos, diterpenos e triterpenos, óleos essenciais, carboidratos, ácidos graxos, entre outros (SFORCIN *et al.*, 2017).

Dentre os produtos apícolas, destaca-se o própolis, o qual tem sido amplamente estudado nos últimos anos, apresentando diversas atividades biológicas e farmacológicas (ÖZKÖK *et al.*, 2021), dentre elas, ação citotóxica, antiproliferativa e antitumoral (SEPÚLVEDA *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2021). Entretanto, esses efeitos são bem caracterizados para o própolis da espécie *Apis mellifera*, sendo ainda pouco avaliado o potencial antitumoral de própolis produzidos por espécies de abelhas sem ferrão (CAMPOS *et al.*, 2021).

Dentre as mais de 20 mil espécies de abelhas catalogadas, 245 são espécies da família Apidae, tribo Meliponini, conhecidas por não apresentarem ferrão (SANTOS *et al.*, 2021), como é o caso da *Tetragona clavipes*, chamada popularmente como Borá.

Câncer por definição, é um termo que abrange mais de cem diferentes tipos de doenças malignas que têm, em comum, o crescimento desordenado de células, algumas com capacidade metastática (INCA, 2021).

Apesar dos avanços no tratamento do câncer, a resistência a quimioterápicos, incluindo fármacos direcionados (terapia-alvo), continua a ser um grande problema na terapia antitumoral, uma vez que a quimiorresistência pode implicar na ocorrência de metástases e reincidência da doença (MANSOORI, *et al.*, 2017). Assim, a busca por novos compostos ou terapias, visando minimizar essa limitação, deve ser intermitente (DIAS, 2012).

Mediante o potencial antiproliferativo e antitumoral apresentado por vários tipos de própolis, investigou-se nesse trabalho o potencial do própolis oriundo da abelha *Tetragona clavipes* na potencialização da ação citotóxica de quimioterápicos utilizados na clínica para o tratamento de câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do extrato de própolis de *Tetragona clavipes* sobre linhagens tumorais e não tumorais e os efeitos de sua associação a quimioterápicos utilizados para o tratamento de cancer de mama.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o potencial citotóxico seletivo do extrato etanólico do própolis de *Tetragona clavipes* sobre as linhagens McCoy, L929, MDA-MB-231, HRT-18, HeLa e HepG2, observando características de susceptibilidade e de seletividade;
- Determinar a influência do extrato de própolis no efeito citotóxico de diferentes quimioterápicos, a curto prazo;
- Determinar, de forma preliminar, o tipo de morte celular induzido pelo própolis e suas combinações com quimioterápicos;
- Avaliar os efeitos das combinações mais efetivas na migração de células tumorais;
- Verificar a recuperação da capacidade proliferativa de linhagens tumorais expostas a combinações.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CÂNCER- ASPECTOS GERAIS

O câncer é a segunda maior causa de morte entre as doenças não-transmissíveis no Brasil, apresentando índice inferior de mortalidade apenas quando comparado ao promovido por doenças cardiovasculares (MANSUR; FAVARATO, 2021). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o triênio 2020-2022 foram estimados 625.000 novos casos desta doença em todo o Brasil, com maior incidência dos cânceres de próstata, colorretal e pulmões nos homens; e de mama, colorretal e colo de útero nas mulheres.

Apesar de existirem distintos tipos de câncer, originários de diversos tecidos e órgãos, esta doença pode ser caracterizada, pelo crescimento e proliferação de células transformadas, as quais podem ser capazes de invadir e se instalar em outros tecidos e órgãos, através da ocorrência de um processo denominado metástase (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Entretanto, cabe esclarecer que nem todo tumor é considerado um câncer. De maneira geral, as neoplasias podem ser classificadas em benignas e malignas, baseando-se nas características e comportamento clínico do tumor, sendo que normalmente tumores benignos são geneticamente simples e estáveis se comparados com os tumores malignos, cuja presença está associada ao desenvolvimento de câncer. Assim, a distinção entre eles é realizada com base em quatro características fundamentais: grau de diferenciação, velocidade de crescimento, invasão local e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Com relação ao grau de diferenciação, as neoplasias benignas são compostas por células bem diferenciadas que se assemelham ao tecido de origem, com crescimento lento, formação de uma estrutura capilar ao redor do tumor para a sua nutrição, e desenvolvimento de uma cápsula fibrosa que o separa do tecido saudável. Já os tumores malignos apresentam diferentes graus de diferenciação celular, desde aqueles constituídos por células bem diferenciadas até os que são formados por células completamente indiferenciadas (anaplásicas). Além disso, tumores malignos

apresentam crescimento rápido e áreas centrais de necrose isquêmica (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em relação a invasão local e metástase, uma neoplasia benigna permanece localizada em seu sítio de origem, não apresentando a capacidade de se infiltrar, invadir ou difundir-se pelo organismo. Já os tumores malignos desenvolvem-se por meio de infiltração, invasão, destruição e penetração no tecido circundante. A capacidade invasiva adquirida por células constituintes de tumores malignos possibilita sua permeação para vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, favorecendo sua disseminação. Em geral, quanto mais anaplásica e maior a neoplasia primária, mais provável será a disseminação metastática e formação de sítios secundários (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer apresenta causa multifatorial, resultante da interação entre fatores endógenos (propensão genética) e exógenos (ambientais), os quais incluem a exposição a carcinógenos (radiação, substâncias químicas), estilo de vida (tabagismo, etilismo, sedentarismo), excesso de peso e hábitos alimentares dos indivíduos (STEWART; WILD, 2014).

A exposição a estes fatores acarreta mutações celulares que atingem quatro classes de genes reguladores: os protooncogenes (promotores de crescimento), os genes supressores de tumor (inibidores de crescimento), os genes que regulam a apoptose e os envolvidos no reparo de DNA. Tais mutações são a base da carcinogênese e da transformação maligna (KREEGER; LAUFFENBURGER, 2010; GREAVES; MALEY, 2012).

Nesse contexto, é importante destacar o papel de tais mutações na promoção da carcinogênese. Mutações de protooncogenes acarretam a formação de oncogenes, os quais, por sua vez, codificam fatores de transcrição e proteínas reguladoras do crescimento ou envolvidas na sobrevivência celular, na interação célula-célula e célula-matriz, favorecendo a proliferação, sobrevivência, migração e invasão. Já as mutações que acometem os genes supressores de tumor, normalmente levam à sua inativação, impedindo sua ação, que é a de controlar o ciclo celular, permitindo que as células tumorais se multipliquem de forma descontrolada e favorecendo o desenvolvimento do fenótipo transformado. Assim, quando associadas,

essas mutações favorecem a proliferação e a sobrevivência de células tumorais em comparação às células não neoplásicas, implicando no desenvolvimento de tumores e do câncer (HERZIG; CHRISTOFORI, 2002; BOLAND; GOEL, 2005; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os genes que regulam a apoptose e os genes de reparo do DNA também interferem diretamente no processo de tumorigênese. Muitos tumores sobrevivem e se desenvolvem devido a mecanismos moleculares que lhes permitem resistir a apoptose (LIVINGSTON; SHIVDASANI, 2001). Pode-se citar por exemplo, o gene *bcl2*, que ao codificar a proteína BCL2, impede a atividade de membros apoptóticos dessa família, permitindo o prolongamento da sobrevivência da célula, e fazendo com que a mesma tenha mais oportunidade de sofrer outras mutações vantajosas (HORVITZ, 1999).

Em relação aos genes de reparo, tem sido relatado que tais mutações apresentam papel crítico na progressão tumoral. Pode-se citar por exemplo alterações genéticas que acometem genes de reparo de *mismatch*, os quais estão associados ao aumento do risco do câncer de cólon e carcinoma cervical. Ainda, mutações nos genes BRCA1, BRCA2 e PALB2 resultam em reparo defeituoso de recombinações homólogas, as quais podem estar envolvidas na carcinogênese de tumores de ovário e mamários (WANG *et al.*, 2019).

Em relação aos tipos de mutações que células tumorais podem apresentar, merecem destaque as mutações pontuais e anomalias cromossômicas não aleatórias, uma vez que são as principais envolvidas na formação de tumores malignos. Em geral, as mutações pontuais, incluem translocações balanceadas, deleções e manifestações cito genéticas de amplificação do gene. A translocação equilibrada leva à carcinogênese por meio da superexpressão de oncogenes ou da produção de novas proteínas de fusão com capacidade alterada de transdução de sinal, que conduzem à proliferação celular. Deleções geralmente afetam genes supressores de tumor, enquanto a amplificação de genes aumenta a expressão de oncogenes (KREEGER; LAUFFENBURGER, 2010).

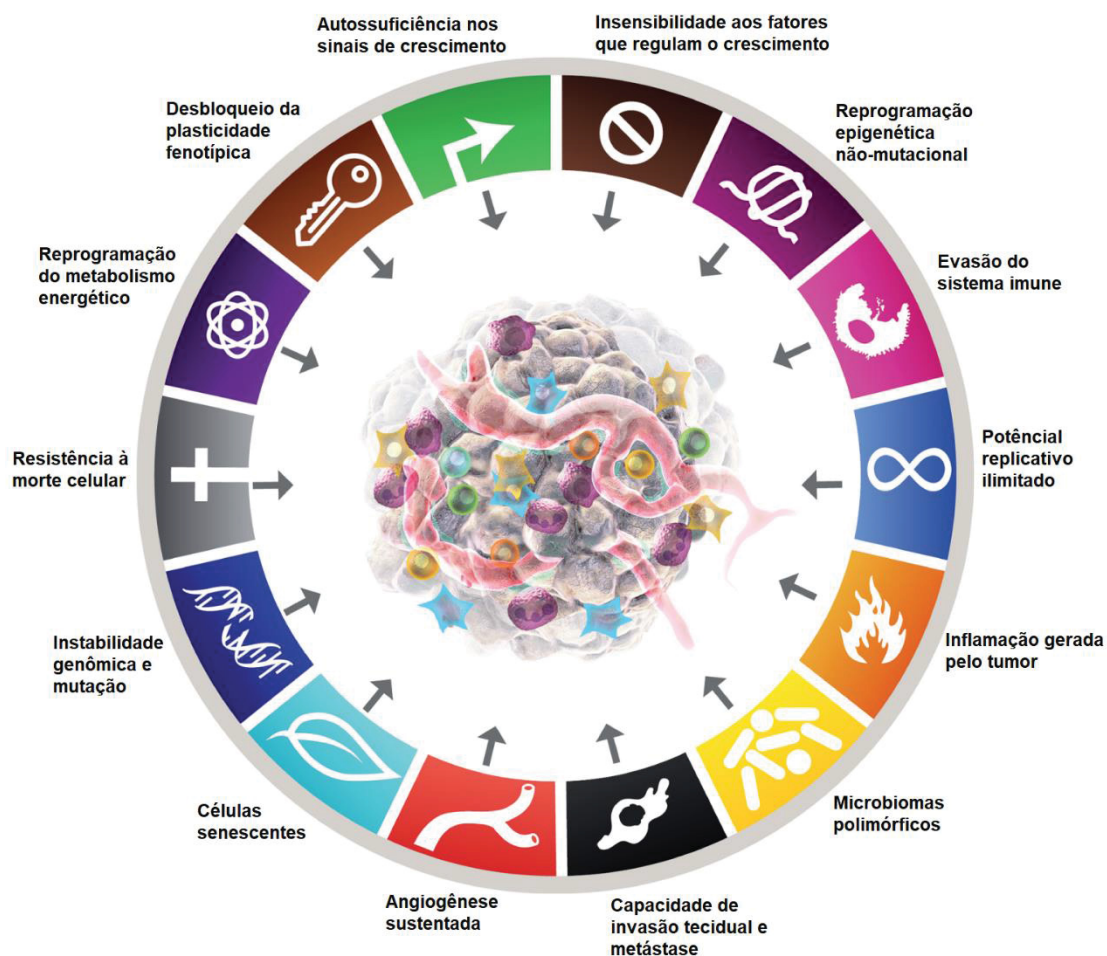
Por fim, é importante salientar que, além dos fatores genéticos e extrínsecos, os cânceres podem ser resultantes de alterações epigenéticas, como o aumento focal

da metilação de DNA e alterações em histonas. As alterações genéticas e epigenéticas modificam a expressão ou função de genes-chave que regulam processos celulares fundamentais, como proliferação, sobrevivência e senescência (GREAVES; MALEY, 2012).

Uma vez iniciado, os cânceres progridem e sofrem seleção natural. A progressão do tumor não é apenas um aumento do seu tamanho, mas também está relacionada à agressividade, malignidade e heterogeneidade celular. Por sua vez, a progressão e a heterogeneidade associada também são resultados de múltiplas mutações que se acumulam de forma independente e em diferentes gerações de células, produzindo subclones com características diferentes, como capacidade de invasão, velocidade de crescimento, capacidade metastática, capacidade de responder a estímulos hormonais e sensibilidade a fármacos quimioterápicos (GREAVES; MALEY, 2012).

Tendo em vista que mutações acarretam na aquisição de características fundamentais para o desenvolvimento e progressão tumoral, Hanahan e Weinberg (2000 e 2011) e Hanahan, 2022 elencaram e denominaram as mesmas como *Hallmarks of cancer*. Tais características foram citadas a seguir : autossuficiência na produção de fatores de crescimento; insensibilidade aos fatores que regulam o crescimento celular; angiogênese sustentada; potencial replicativo ilimitado; capacidade de invasão tecidual e metástase; evasão da apoptose; reprogramação do metabolismo energético; evasão do sistema imune; instabilidade genômica e mutação; inflamação pró-tumoral; desbloqueio da plasticidade fenotípica; reprogramação epigenética não-mutacional; criação de microbiomas polimórficos e indução de senescência.

FIGURA1 -Hallmarks of cancer



FONTE: Adaptado de Hanahan, 2022;

LEGENDA: As principais características biológicas adquiridas pelas células durante o processo da carcinogênese.

O tratamento do câncer envolve abordagens locais como cirurgia, radioterapia e terapia fotodinâmica, bem como abordagens sistêmicas como quimioterapia, administração de fármacos antiangiogênicos, hormônioterapia, terapia alvo e imunoterapia, com intuito curativo ou paliativo (BURNEY; AL-MOUNDHRI, 2008; PALUMBO *et al.*, 2013).

A quimioterapia é a abordagem sistêmica mais empregada, geralmente é aplicada em conjunto com terapias locais, como a cirurgia e a radioterapia. Embora os quimioterápicos em geral sejam eficazes em destruir células neoplásicas, o grande desafio para o tratamento do câncer, consiste na ação distinta dos fármacos empregados na quimioterapia, sobre células neoplásicas e células não tumorais. Essa

falta de especificidade dos quimioterápicos é um grave fator limitante, uma vez que está associado à incidência de diversos efeitos adversos como: diarreia, vômitos, náuseas, alopecia, maior susceptibilidade a infecções, bem como na multirresistência aos quimioterápicos (BRANDÃO *et al.*, 2010; PALUMBO *et al.*, 2013; UY *et al.*, 2015).

Como consequência do avanço da doença, é necessário o planejamento estratégico global a curto, médio e longo prazo, com incentivo a hábitos de vida mais saudáveis, ações para identificação precoce da doença, acessibilidade a tratamentos eficazes e estímulo a sociedade científica na procura de novas substâncias ou alternativas, que levem a cura ou a melhora da qualidade de vida do indivíduo que desenvolve esta doença (BARBOSA *et al.*, 2015; FERLAY *et al.*, 2015; CUZICK, 2017).

Investigar compostos mais efetivos e seletivos que diminuam esse crescente problema é um desafio, e produtos naturais mostram-se como uma alternativa para essa problemática, justificando a execução do presente trabalho (DIAS, 2012).

3.2. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente e a mais mortal para o sexo feminino no Brasil e no mundo (WHO, 2020). No ano de 2021 foram relatados 66.280 novos casos e 18.295 mortes por essa malignidade no Brasil (INCA, 2021). A estimativa aponta para a ocorrência de 130 mil casos da doença no Brasil no ano de 2040, bem como a morte de 33.500 pessoas no país em decorrência da mesma (WHO, 2020).

O carcinoma mamário é causado pela multiplicação desordenada de células anormais da mama (INCA, 2021). Normalmente, inicia-se nas células dos lóbulos, que são as glândulas produtoras de leite, ou nas células dos dutos, responsáveis por drenar o leite dos lóbulos para o mamilo. Menos comumente, o câncer de mama pode ter início no estroma mamário, que inclui os tecidos conjuntivos fibrosos e gordurosos da mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Ao longo do tempo, as células tumorais podem invadir o tecido mamário saudável circundante e migrar para os

linfonodos axilares, podendo se estabelecer nos gânglios linfáticos e se disseminar para outras regiões do organismo (SCULLY *et al.*, 2012).

Em relação às causas, cerca de 5 a 10% dos tumores de mama são hereditários, sendo que o restante decorre de mutações genéticas resultantes do processo de envelhecimento das células e exposição aos fatores de risco (EHEMAN *et al.*, 2009).

A idade é um dos mais importantes fatores de risco para a doença (cerca de quatro em cada cinco casos ocorre após os 50 anos). Outros fatores incluem: obesidade, tabagismo, inatividade física, consumo de bebidas alcoólicas, histórico familiar de câncer de mama ou ovário, menstruação precoce, uso de contraceptivos, não ter tido filhos ou primeira gravidez após os 30 anos, entre outros (INCA, 2021).

As alterações genéticas comumente encontradas neste tipo de câncer são decorrentes de mutações em protooncogenes e em genes supressores de tumor. A alteração mais bem caracterizada no câncer de mama é a superexpressão do protooncogene HER-2, que sofre amplificação em cerca de 30% dos cânceres de mama invasivos. Os produtos desse gene são proteínas que atuam como receptores de fatores de crescimento e sua superexpressão faz com que as células neoplásicas se multipliquem de forma descontrolada (BURSTEIN *et al.*, 2004; SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009).

Em relação aos tumores de mama originários a partir de características hereditárias, observa-se que mulheres que apresentam mutações nos genes BRCA-1 ou BRCA-2, dois genes supressores tumorais, são mais propensas a desenvolver carcinoma mamário. Acredita-se que os mesmos atuem promovendo o reparo do DNA (SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009) e sua ligação com o câncer da mama ainda não é clara.

A classificação molecular estratifica o câncer de mama em quatro subtipos: luminal A, luminal B, HER-2 amplificado e câncer de mama basal (KUMAR *et al.*, 2013). O subtipo luminal A refere-se a tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER-2. Já os tumores do subtipo luminal B expressam RE, RP e superexpressam HER-2. O subtipo HER-2 amplificado apresenta elevada expressão

da oncoproteína HER-2, porém ausência da expressão de receptores hormonais (RE e RP). Por fim, o subtipo basal não apresenta receptores hormonais, bem como não superexpressa HER-2, sendo chamados de tumores triplo negativos (CIRQUEIRA *et al.*, 2011).

O subtipo luminal A apresenta o melhor prognóstico em relação aos demais. Em sua maioria, são tumores histologicamente de baixo grau, ou seja, constituídos por células com crescimento lento e semelhantes ao tecido fisiológico da mama, e apresentam resposta à quimioterapia; já os tumores luminais B apresentam maior proliferação e são, muitas vezes, de alto grau histológico (crescimento acelerado e tecido diferenciado), não apresentando resposta à quimioterapia. O subtipo HER-2 amplificado tem menor sobrevida livre de doença e elevada taxa de recorrência, porém é responsivo a terapias alvo-específicas. Por fim, o subtipo basal demonstra pior prognóstico, estando associado à menor sobrevida livre de doença e a menor sobrevida global, apresenta resposta à quimioterapia se feita nos estágios iniciais da doença, somada a radioterapia. Em estágios mais avançados, a cirurgia de mastectomia é realizada antes do tratamento com os quimioterápicos (CIRQUEIRA *et al.*, 2011). O QUADRO 1 resume as características moleculares e o prognóstico dos diferentes subtipos moleculares do câncer de mama.

QUADRO1: Características e prognóstico dos subtipos moleculares do câncer de mama.

Subtipos moleculares de câncer de mama	Fenótipo	Prognóstico
Luminal A	RE+ e/ou RP+ e HER-2-	<ul style="list-style-type: none"> • Melhor prognóstico • Baixo grau de histologia • Responde bem a quimioterapia
Luminal B	RE+ e/ou RP+ e HER-2+	<ul style="list-style-type: none"> • Maior proliferação • Alto grau de histologia • Chances altas de recidiva
HER-2 amplificado	RE-, RP- e HER-2+	<ul style="list-style-type: none"> • Responde bem a terapias-alvo • Chances altas de recidiva • Baixa sobrevida livre de doença

Basal	RE-, RP- e HER-2-	<ul style="list-style-type: none"> • Pior prognóstico • Baixa sobrevida livre de doença • Baixa sobrevida global
-------	----------------------	---

FONTE: Adaptado de CIRQUEIRA *et al.*, 2011

O câncer de mama também é classificado conforme sua capacidade de invasão, ou seja, a sua habilidade de penetrar ou não na membrana basal limitante. Aqueles que permanecem dentro desse limite são chamados de carcinomas *in situ*, por se tratarem de carcinomas não invasivos, apresentando melhores respostas à quimioterapia; já aqueles que se difundem para além dele são designados como carcinomas invasivos, mais difíceis de responder a quimioterapia dependendo do estágio da doença. Nesta classificação, as principais formas de carcinoma de mama não invasivo são o carcinoma ductal *in situ* - CDIS, e o carcinoma lobular *in situ* - CLIS. Já as principais formas de carcinoma de mama invasivo são o carcinoma ductal invasivo - CDI, o carcinoma lobular invasivo - CLI, o carcinoma medular, o carcinoma colóide, o carcinoma tubular, dentre outros (SIMPSON *et al.*, 2003; BURSTEIN *et al.*, 2004). O CDI representa entre 70 a 80% de todos os cânceres de mama detectados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

O rastreamento e a detecção do câncer de mama são feitos por exames de imagem. As técnicas moleculares são complementares ao diagnóstico. Quando há suspeita de câncer de mama detectado por métodos tradicionais, como o exame físico, a mamografia ou o ultrassom, deve-se realizar biópsia da mama para a execução de exame histopatológico, permitindo avaliar as características intrínsecas do tumor e classificá-lo histologicamente através da realização de imunohistoquímica (IHQ), técnica muito utilizada para verificar a positividade para receptores hormonais, e classificar os tumores de acordo com suas características moleculares (CHALA; BARROS, 2007; INCA, 2021). Além da IHQ, a classificação molecular do carcinoma de mama pode ser feita através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou *microarray* (DELMONICO *et al.*, 2015).

Após confirmação do diagnóstico, deve ser realizada uma anamnese do paciente, focando no histórico familiar, na existência de comorbidades e de fatores de risco, bem como na evolução cronológica da doença. Ainda, deve-se realizar o exame

físico completo para a detecção de outros potenciais sítios secundários do tumor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O tratamento do câncer de mama depende do estadiamento da doença, da classificação molecular, da localização e do tamanho do tumor, bem como da ocorrência de metástases (CIRQUEIRA *et al.*, 2012; INCA, 2021). As modalidades de tratamento do carcinoma de mama são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hormônioterapia e terapia-alvo. A cirurgia e a radioterapia são indicadas para o tratamento loco-regional. Já a quimioterapia, a imunoterapia, a hormônioterapia e a terapia-alvo são utilizadas como tratamento sistêmico (WOLFGRAMM *et al.*, 2013).

A cirurgia geralmente é o tratamento inicial do câncer de mama, e pode envolver a excisão cirúrgica da mama inteira (mastectomia total) ou partes da mama, podendo ainda envolver ou não o esvaziamento axilar, que é a retirada de linfonodos da axila (MACEDO *et al.*, 2020).

A radioterapia é utilizada como tratamento adjuvante (após a cirurgia), como tratamento paliativo e como tratamento neoadjuvante (antes da cirurgia) e consiste na aplicação de radiação ionizante com o intuito de destruir ou inibir o crescimento das células tumorais (DELANEY *et al.*, 2005).

A quimioterapia, assim como a radioterapia, pode ser utilizada como tratamento adjuvante ou neoadjuvante. No tratamento adjuvante, quimioterápicos são administrados após a cirurgia para destruir as células neoplásicas remanescentes do procedimento cirúrgico ou mesmo disseminadas, que não podem ser visualizadas pelos exames de imagem. Já no tratamento neoadjuvante, fármacos quimioterápicos são administrados antes da cirurgia para tentar reduzir o tamanho do tumor, de modo que possa ser extraída uma porção tecidual de menor extensão. Os fármacos mais frequentemente utilizados em ambas as modalidades são: antraciclinas (doxorrubicina e epirrubicina), taxanos (paclitaxel e docetaxel), 5-fluorouracil ou capecitabina, ciclofosfamida e carboplatina. Na maioria dos casos são utilizadas combinações dos mesmos (American Cancer Society, 2019).

A imunoterapia, por sua vez, atua estimulando o sistema imunológico do paciente a reconhecer e destruir as células tumorais. A associação mais comum de fármacos aplicados para este fim é a combinação de atezolizumabe e abraxane (ESFAHANI *et al.*, 2020)

A hormônioterapia, na maioria dos casos é utilizada como terapia adjuvante, sendo aplicada apenas em tumores que expressam receptores hormonais. Os fármacos mais utilizados são aqueles que bloqueiam receptores de estrogênio (tamoxifeno, toremifeno, fulvestranto), bem como os que impedem a produção de desse hormônio (letrozol, anastrozol, exemestano) (American Cancer Society, 2019).

A terapia-alvo é um tipo de terapia dirigida a células específicas. Pode ser realizada por meio da administração de anticorpos monoclonais, anticorpos-fármaco conjugado, inibidores de cinase (para câncer de mama HER2+), inibidores de CDK4/6, inibidores de mTOR ou de PI3K (para cancer de mama RE+ ou RP+) e anticorpos-fármaco conjugado (para câncer de mama triplo negativo) (American Cancer Society, 2019).

Quando a doença é diagnosticada no início, o tratamento tem maior potencial curativo. No caso de a doença já apresentar metástases, o tratamento busca prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2021). Ainda, deve-se considerar que o câncer de mama é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Tumores mamários com histologia e clínica semelhantes, podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas (GEYER *et al.*, 2009). Dentro desse contexto, a busca por novos fármacos ou abordagens terapêuticas para o carcinoma de mama, apresenta grande relevância.

3.3.MECANISMOS DE MORTE CELULAR

Antigamente, o Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular (NCCD), utilizava apenas critérios morfológicos para classificar os mecanismos de morte celular em três tipos principais: apoptose, necrose e autofagia. Apesar dessa classificação ser amplamente utilizada até a atualidade, ao longo do desenvolvimento

de estudos na área, verificou-se que esta é obsoleta, e que uma classificação mais adequada deve considerar, além dos critérios morfológicos, aspectos genéticos, bioquímicos, farmacológicos e funcionais dos mecanismos de morte celular, distinguir as causas dos aspectos correlacionados ao processo de morte e identificar células cujo mecanismo envolve a permeabilização irreversível da membrana plasmática ou a fragmentação celular completa (GALLUZZI *et al.*, 2018).

Dessa forma, o NCCD, propôs uma nova classificação para os mecanismos de morte celular, em dois grandes grupos: mecanismos de morte acidental (ACD) e mecanismos de morte programada (RCD). Para esse último grupo, passou-se a considerar os mecanismos de transdução de sinal envolvidos na iniciação, execução e propagação da morte celular, bem como a relevância fisiopatológica desses processos (GALLUZZI *et al.*, 2018).

3.3.1. Morte celular acidental

A morte celular acidental corresponde a uma forma instantânea e incontrolável de morte, que envolve ruptura irreversível da membrana plasmática. Suas causas incluem a exposição das células a condições físicas, químicas ou mecânicas extremas como altas temperaturas, pressões ou forças osmóticas, variações extremas de pH e força de cisalhamento (GALLUZZI *et al.*, 2018).

3.3.2. Morte celular programada

3.3.2.1. Apoptose extrínseca e apoptose intrínseca

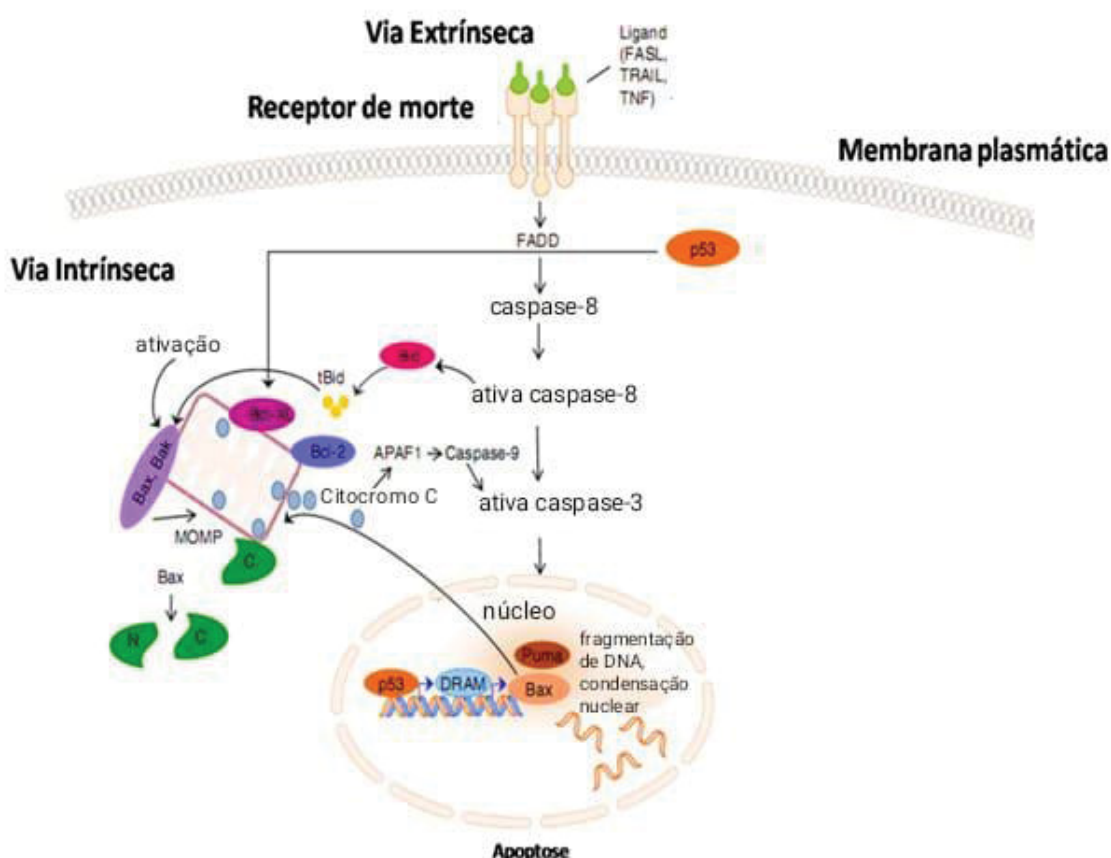
A apoptose é uma forma característica de morte celular programada, com importante papel durante o desenvolvimento e a homeostase celular, bem como em uma variedade de doenças, como Alzheimer, Parkinson e no câncer (MAURILLO *et al.*, 2001; OBENG, 2021).

Ao sofrer apoptose, a célula apresenta alterações morfológicas e bioquímicas típicas, como encolhimento celular e condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos, extravasamento do Citocromo C da mitocôndria para o citosol,

externalização da fosfatidilserina na membrana celular, ativação de proteases e fragmentação do DNA (HENGARTNER, 2000; ADAMS; COOPER, 2007).

As vias de sinalização que desencadeiam o processo apoptótico são complexas, sendo subdivididas principalmente em duas: apoptose extrínseca e apoptose intrínseca (FIGURA2) (PEREIRA, 2014).

FIGURA2 - Ativação da apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca



FONTE: Adaptado de NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013.

LEGENDA: A via intrínseca, quando ativada, aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial liberando proteínas do espaço intermembranar, como o Citocromo c, que se associa a Apaf-1, formando o apoptossomo. Esse complexo ativa a caspase-9, que cliva caspases efetoras 3, 6 e 7, as quais realizam a fragmentação do DNA. A via extrínseca ativa receptores de membrana (FASL, TRAIL, TNF) que se associam aos seus receptores correspondentes DD, formando o complexo FADD, que ao se associar e ativar a caspase-8, inicia a cascata de caspases, ativando as caspases efetoras 3, 6 e 7 que realizam a fragmentação do DNA.

A via extrínseca é desencadeada pela interação entre sinais de estresse celular com os receptores de morte TNFR, TRAIL e Fas. O estímulo do ligante de morte resulta na oligomerização dos receptores e no recrutamento de proteínas adaptadoras

(por exemplo a FADD), bem como de uma caspase iniciadora (normalmente a caspase 8), formando o complexo de sinalização de indução de morte (DISC) (GALLUZZI *et al.*, 2011). A formação do DISC acarreta na ativação das caspases efetoras (3, 6 e 7), que, por sua vez, clivam alvos e proteínas que incluem enzimas de reparo do DNA, proteínas do citoesqueleto e moléculas envolvidas na progressão do ciclo celular, gerando mudanças morfológicas associadas a apoptose e a ocorrência de morte celular (CURTIN; COTTER, 2003).

Já a apoptose intrínseca pode ser desencadeada por uma infinidade de estresses intracelulares, tais como irradiação, quimioterápicos, vírus, bactérias, ausência de fatores de crescimento celular e hipóxia (PEREIRA, 2014). Embora os estímulos iniciadores da via intrínseca da apoptose sejam altamente heterogêneos, todos culminam na despolarização da mitocôndria e extravasamento de proteínas apoptóticas (GALLUZZI *et al.*, 2011).

A via intrínseca envolve o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria para o citosol, particularmente o Citocromo c. Este, uma vez no citoplasma, associa-se a Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando o apoptossomo. Caspases executoras são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose (GOTTLIEB, 2000).

A regulação positiva da via intrínseca é realizada pelos membros da família BCL2, proteínas citoplasmáticas capazes de integrar sinais de sobrevivência ou morte celular gerados nos meios intra e extracelular (KOLLENKO *et al.*, 2000). Essa família subdivide-se em duas classes: proteínas pró-apoptóticas (BAX, BCLXL, BCLW, McCL1, A1), as quais sensibilizam ou conduzem a célula à apoptose e anti-apoptóticas (BCL2 e BCLX) (KOLLENKO *et al.*, 2000). Dentre os membros pró-apoptóticos mais frequentemente ativados, destaca-se a proteína BAX; já dentre os membros anti-apoptóticos mais envolvidos no controle da apoptose, merece destaque o BCL-2. A proteína BAX, ao se oligomerizar na forma de homodímero Bax/Bax, promove a formação de poros na mitocôndria, e a liberação de Citocromo c para o citosol, acarretando no desencadeamento de apoptose. Por sua vez, a proteína BCL-2 pode sequestrar BAX, levando a formação do heterodímero BAX/BCL-2 na membrana mitocondrial, impedindo o extravasamento do Citocromo c e o desencadeamento da via intrínseca (ANAZETTI; MELO, 2007).

A via mitocondrial também é susceptível à regulação negativa pelas proteínas da família das Proteínas inibidoras de Apoptose (IAPs), tais como CIAP1, CIAP2, XIAP e survivina, as quais podem inibir, por exemplo, as caspases 3 e 9.

Pesquisas realizadas sobre o processo de apoptose demonstram que este é um processo importante na quimioterapia do câncer, uma vez que diversos fármacos quimioterápicos exercem seu efeito antitumoral a partir da indução de apoptose (MIZUTANI *et al.*, 2005; BRENES *et al.*, 2007).

3.3.2.2. Necrose regulada

A necrose foi considerada por muito tempo como um mecanismo de morte celular acidental. É um processo que envolve a perda da integridade da membrana, com inchaço citoplasmático, formação de vacúolos, distensão ou rompimento mitocondrial, lise dos lisossomos e liberação do conteúdo citosólico para o tecido circundante (CHAMOND *et al.*, 1999; KUROSAKA *et al.*, 2003).

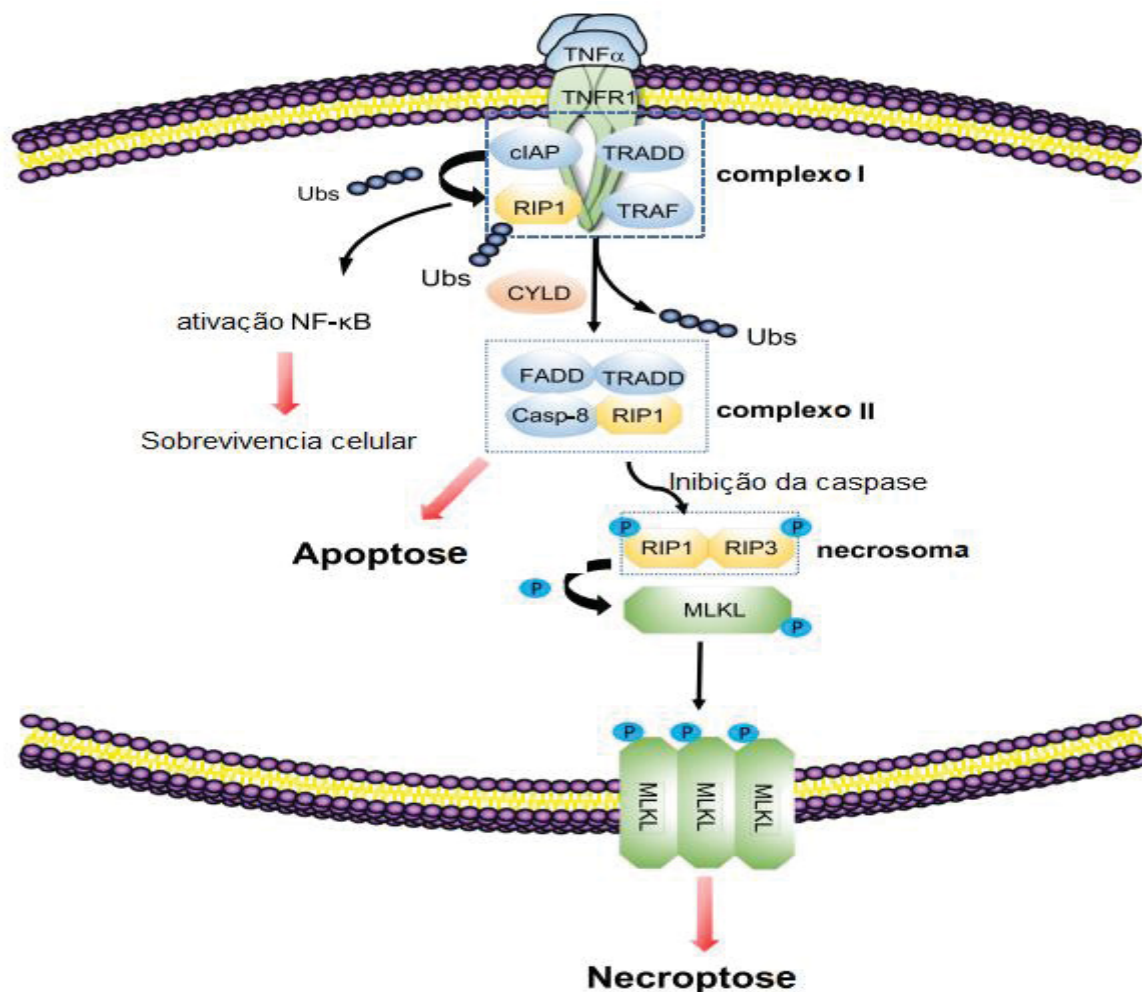
Atualmente sabe-se que a necrose pode ocorrer de forma regulada, a partir de um mecanismo chamado necroptose, o qual ocorre em condições fisiológicas e patológicas (FULDA, 2013). Ainda, o termo necroptose é utilizado como um sinônimo de necrose programada que depende da atividade da Proteína Cinase de Interação com o Receptor-1 (RIPK1) (KROEMER *et al.*, 2008).

A ativação da necroptose pode acontecer pelos mesmos ligantes que ativam a apoptose, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) (FIGURA3). Nessa via, o ligante TNF α se liga ao receptor TNFR1 e aciona o recrutamento das proteínas de Domínio de Morte Associado à TNFR (TRADD), RIP-1, IAPs, Fator Associado a TNFR2 (TRAF-2) e Fator Associado a TNFR5 (TRAF-5), que constituem uma estrutura chamada de Complexo I. Uma vez formado este complexo, RIP-1 pode sofrer poliubiquitinação pela ação de IAPs, acionando a ativação de NF-kB e levando conseqüentemente, a sobrevivência celular. Entretanto, devido à rápida internalização de ligantes do receptor TNF, as proteínas do Complexo I, bem como sua modificação pós-traducional, são conseqüentemente alteradas. Dessa forma, RIP-1 sofre desubiquitinação catalisada pela deubiquitinase cilindromatose (CYLD), limitando a

ativação da sinalização do NF- κ B, e favorecendo a ativação de vias de morte celular. Dessa forma, ocorre o recrutamento de outras proteínas (FADD e caspase-8), alterando a composição do complexo, que passa a se chamar Complexo II, também conhecido como riptossomo, levando a ativação de caspase-8, bem como a clivagem e inativação de RIP-1 e RIP-3, e desencadeando a apoptose. No entanto, quando a caspase-8 não pode ser ativada devido a condições genéticas ou farmacológicas, RIP cinases fosforilam e ativam RIP1 e RIP3, formando assim um complexo molecular chamado de necrossoma.

Uma vez formado o necrossoma, RIP3 fosforila MLKL, que oligomeriza-se, sendo translocada para a membrana plasmática, promovendo a permeabilização necrótica da mesma e culminando em morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2011; GONG *et al.*, 2019).

FIGURA 3 - Vias de sinalização molecular da necroptose.



FONTE: Adaptado de GONG *et al.*, 2019.

LEGENDA: Ocorre a formação do complexo I através da ligação do TNF α ao seu receptor TNFR1 e o recrutamento de IAP, TRAF e TRADD. RIP-1 sofre desubiquitinação por cilindromatose (CYLD) e recruta outras proteínas que irão formar o Complexo II. RIP1 e RIP3 fosforilam e formam o necrossoma que gera sinais pró-necróticos que desencadeiam a morte celular por necroptose.

3.3.2.3. Outros tipos de morte celular programada

A TABELA 1 mostra, além da apoptose e da necroptose, os outros tipos de morte celular programada definidos pela NCCD, suas características morfológicas, bioquímicas e principais reguladores.

TABELA 1 - Tipos de morte celular programada

Tipo	Características morfológicas	Características bioquímicas	Principais reguladores
Piroptose	Ausência de inchaço celular; Ruptura de membrana plasmática; Condensação moderada de cromatina.	Ativação de CASP1, CASP3 e GSDMD; Clivagem GSDMD; Formação de poros induzido por GSDMD-N; Liberação de IL1B	Positivo: CASP1, CASP11, e GSDMD Negativo: GPX4, ESCRT-III, PKA
Ferroptose	Mitocôndrias menores; Redução da crista mitocondrial; Elevação da densidade de membrana mitocondrial; Aumento da ruptura da membrana mitocondrial.	Acúmulo de ferro; Peroxidação lipídica; Dissipação de $\Delta\Psi_m$; MAP1LC3B-I para conversão de MAP1LC3B-II; glutaminolise; Caspase independente	Positivo: TFRC, ACSL4, LPCAT3, ALOX15, GLS2, DPP4, NCOA4, BAP1, BECN1, PEBP1, CARS, VDAC2/3, RAB7A, HSP90, e ALK4/5 Negativo: SLC7A11, GPX4, NFE2L2, HSPB1, HSPA5, FANCD2, NFS1, ITGA6, ITGB4, e OTUB1 Ambos: TP53
Parthanatos	Condensação da cromatina; Grande fragmentação de DNA; Perda de integridade da membrana; Inchaço celular.	Ativação excessiva de PARP1; Dissipação de $\Delta\Psi_m$; Caspase independentes; NAD ⁺ e depleção de ATP; Acúmulo de poli-polímeros de ADP-ribose (PAR); Liberação de AIFM1 da mitocôndria para o núcleo	Positivo: PARP1, AIFM1, MIF, e OGG1 Negativo: ADPRHL2 e RNF146
Entose	Estrutura célula-a-célula.	Ativação de proteínas de adesão e actomiosina; LC3 associada à fagocitose	Positivo: CDH1, CTNNA1, AMPK, RHOA, ROCK, miosina, ATG5, ATG7, PI3KC3, BECN1, CYBB, UVRAG, e RUBCN Negativo: CDC42 e RNF146

Netose	Ruptura da membrana plasmática; Colapso da membrana nuclear; Liberação de fibras de cromatina.	Formação de NETs; Liberação e translocação de enzimas granulares; Citrulinação de histonas	Positivo: ELANE, MMP, MPO, CAMP/LL37, e PADI4
Morte celular dependente de lisossomo	Ruptura do lisossomo e da membrana plasmática.	Permeabilização da membrana lisossomal; Liberação de enzimas hidrolíticas lisossômicas; Lesão oxidativa induzida pelo ferro lisossomal	Positivo: catepsinas, STAT3, e TP53 Negativo: NF-κB e MCOLN1

FONTE: Adaptado de Tang *et al.*, 2019.

3.4. METÁSTASE

A metástase é um processo pelo qual células tumorais se disseminam a partir do tumor primário por meio de vasos sanguíneos e linfáticos, instalando-se e crescendo em outro (s) órgão (s), e levando a formação de um sítio tumoral secundário (GUAN, 2015). Trata-se de um evento complexo que envolve várias etapas sequenciais como dissociação, migração, invasão e adesão (WEBER, 2013). Estas, por sua vez, são controladas por alterações genéticas e epigenéticas adquiridas e acumuladas durante o processo de progressão tumoral (ARVELO *et al.*, 2016).

Metástases a partir de uma neoplasia primária, em geral, formam-se em um órgão distante, seguindo um fenômeno denominado tropismo metastático (GERAUD *et al.*, 2014). Dessa forma, as células neoplásicas circulantes são aprisionadas na microvasculatura de determinados órgãos que têm características moleculares e de microambiente específicas, para então instalarem-se, proliferarem e estabelecerem um novo sítio tumoral (GERAUD *et al.*, 2014).

Para que ocorra a metástase, as células neoplásicas devem dissociar-se do tumor primário por meio da perda de sua capacidade de adesão e migrar para a circulação, através do fenômeno de transição epitélio-mesenquimal (EMT). A EMT é um processo biológico reversível pelo qual uma célula epitelial modifica sua polaridade e suas propriedades adesivas para um fenótipo de célula mesenquimal. Tais células apresentam ainda alterações no citoesqueleto, resistência à apoptose e ganho na capacidade de migração e invasão, o que favorece sua locomoção e sobrevivência no microambiente do tecido conjuntivo (LIM; KALDIS, 2013).

Muitas vias de sinalização estão implicadas na indução da EMT em células neoplásicas, destacando-se a ativação dos seguintes receptores: de tirosina cinase, do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), do Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF2), do Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF), do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1), da via de sinalização da Wnt, do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B) e do Fator de Crescimento Transformante *beta* (TGF β) (SAVAGNER, 2010).

Uma vez que atingem, via circulação, o local onde será formado o sítio secundário, células tumorais devem migrar do interior dos vasos para o tecido, através de um processo conhecido como extravasamento. O mecanismo de extravasamento é similar àquele de invasão, mas em direção oposta, e depende das interações entre células neoplásicas e endoteliais, bem como da permeabilidade vascular (BROWN *et al.*, 2011).

Uma vez presentes no órgão-alvo, as células neoplásicas induzem a ocorrência de adaptações para favorecer sua instalação e formação do sítio secundário. Nesse sentido, pode-se citar a indução da síntese de fatores pró-angiogênicos para a formação de uma nova rede vascular, a fim de propiciar o aporte nutricional e de oxigênio necessários para a manutenção de seu metabolismo (LEMOS, 2016). Para isso, a presença de angiocinas como HGF, TGF β e citocina antagonista da Angiopietina-2 (Ang2) no meio extracelular perivascular são determinantes (KOBILINSKI *et al.*, 2005).

3.5. *Tetragona clavipes*

As abelhas são um dos principais e mais importantes grupos de insetos para o homem. Apesar de serem predominantemente conhecidas como produtoras de mel, as abelhas também fornecem cera, própolis, pólen, geleia real, entre outros produtos, e podem ser criadas para a exploração dos mesmos (EGGERT, 2016). Entretanto, economicamente, não são importantes somente pelos produtos que fornecem para o uso humano, deve-se levar também em consideração a atividade polinizadora destes insetos, uma vez que um terço da alimentação humana depende direta ou indiretamente da polinização realizada por abelhas (VILLAS-BÔAS, 2012).

Há mais de 25 000 espécies de abelhas conhecidas, as quais são distribuídas em sete famílias biológicas reconhecidas. A *Tetragona clavipes*, espécie produtora do própolis avaliado neste trabalho, pertence à família Apidae, tribo Meliponini, que se trata da tribo das abelhas “sem ferrão” (VILLAS-BÔAS, 2012).

Os meliponíneos, ocorrem em grande parte das regiões tropicais da Terra, ocupando praticamente toda a América Latina e África, além do sudeste asiático e norte da Austrália. Caracterizam-se por serem sociais, possuem o ferrão atrofiado impossibilitando o seu uso e são os principais responsáveis pela polinização da grande maioria das espécies vegetais em nosso país (DUARTE, 2012).

A *T. clavipes*, é conhecida popularmente como Borá, palavra derivada do termo "hebora", que no idioma tupi significa "o que há de ter (mel)" (RODRIGUES *et al.*, 2007). Trata-se de uma espécie caracterizada por uma população numerosa e que apresenta agressividade acentuada na abertura do ninho ou mesmo ao passar à frente da entrada da colmeia (RODRIGUES *et al.*, 2007). Como possui ferrão atrofiado, a Borá defende seu ninho através de mordiscadas. Além disso, realiza a deposição de própolis no invasor como comportamento defensivo, impedindo-o de continuar seu avanço para dentro da colmeia (EGGERT, 2016).

No Brasil, a abelha Borá é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e em São Paulo (EGGERT, 2016).

3.6. PRÓPOLIS

Própolis é a denominação genérica utilizada para descrever uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, às quais são acrescentadas secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (FUNARI, 2006). Geralmente é constituído de 50% de bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e 5% de pólen (ÖZKÖK *et al.*, 2021).

Devido as suas propriedades mecânicas e antimicrobianas, o própolis é muito utilizado na construção e adaptação da colmeia garantindo a criação de um ambiente asséptico (FUNARI, 2006). Quanto à composição química, esta varia de acordo com

sua origem botânica e geográfica, bem como de acordo com a espécie de abelha que o produz, apresentando quantidades variáveis de compostos fenólicos, diterpenos e triterpenos, óleos essenciais, carboidratos, ácidos graxos, dentre outros (SFORCIN *et al.*, 2017).

Desde a década de 1950, cientistas tem isolado componentes importantes do própolis e comprovado seus benefícios. Dessa forma, o própolis e seus compostos apresentam grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas comprovadas (ÖZKÖK *et al.*, 2021), que tornaram-no um alimento complementar popular em todo o mundo na década de 2000 (ZACCARIA *et al.*, 2017). Dentre as ações farmacológicas descritas, pode-se citar: atividade antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, antiúlcera, antidiabética, anti-inflamatória, antígenotóxica e antiviral (SFORCIN, 2007; BARROS *et al.*, 2008; EL-SAYED *et al.*, 2009; SFORCIN, BANKOVA, 2011; WATANABE *et al.*, 2011; CHAN *et al.*, 2013; BAYRAM *et al.*, 2015; ASGHARPOUR *et al.*, 2019; PRZYBYŁEK, KARPIŃSKI, 2019).

Por fim, é importante ressaltar que o própolis também é utilizado na medicina tradicional e complementar, como por exemplo na cicatrização de aftas, feridas orais e queimaduras (MARTINOTTI; RANZATO, 2015), sendo um importante produto apícola aplicado na “Apiterapia” (WEIS *et al.*, 2022). Durante a pandemia de COVID-19, a eficácia do própolis contra o vírus SARS-CoV-2 chegou a ser avaliada, sugerindo que este produto diminui os sintomas clínicos da doença e o tempo de manifestações dos sintomas (BACHEVSKI *et al.*, 2020; MIRYAN *et al.*, 2020).

3.6.1. Principais mecanismos relacionados a ação antitumoral de própolis e seus compostos

É amplamente descrito na literatura que o efeito antitumoral do própolis está associado à interferência em diversos processos relacionados ao desenvolvimento e progressão tumoral, tais como sobrevivência e proliferação celular, e sinalização oncogênica (SEPÚLVEDA *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2021).

3.6.1.1. Mecanismos de morte celular

Análises de citometria de fluxo em combinação com marcadores como iodeto de propídeo e Annexina V têm sido úteis para caracterizar os efeitos citotóxicos de própolis em linhagens tumorais, evidenciando a indução de apoptose inicial, tardia ou mecanismos semelhantes à necrose (EZRAHI *et al.*, 2019; DESAMERO *et al.*, 2019).

A Tabela 2 apresenta os tipos de morte celular induzido por diversos tipos de própolis de abelhas sem ferrão ou compostos isolados dos mesmos sobre várias linhagens tumorais, bem como os mecanismos moleculares envolvidos na mediação deste efeito.

TABELA 2 - Tipos de morte celular induzidos por própolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão em várias linhagens de câncer

Espécies de abelhas	Tipo de extrato ou composto isolado	Linhagem celular	Tipo de morte celular	Mecanismo de ação	Referências
<i>Trigona</i> sp.	Hidroetanólico = Etanol 70% + Água 30%	Adenocarcinoma de colón humano (HT-29 e Caco-2) Melanoma murino (B16F1)	Apoptose	NE	CHOUDHARI <i>et al.</i> , 2013
<i>Melipona orbignyi</i>	Hidroetanólico = Etanol 80% + Água 20%	Leucemia humana (K562)	Necrose	NE	CAMPOS <i>et al.</i> , 2014
<i>Tetragonisca fiefbrigii</i>	Hidroetanólico = Etanol 80% + Água 20%	Leucemia humana (K562)	Necrose* e Apoptose**	NE	CAMPOS <i>et al.</i> , 2015
<i>Trigona incisa</i>	Metanólico fracionado (acetato de etila e hexano)	Adenocarcinoma de colón (SW620)	Apoptose	NE	KUSTIAWAN <i>et al.</i> , 2015
<i>Scaptotrigona depilis</i> ; <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Hidroetanólico = Etanol 80% + Água 20%	Leucemia humana (K562)	Necrose* e Apoptose**	NE	BONAMIGO <i>et al.</i> , 2017
<i>Plebeia droryana</i>	Hidroetanólico = Etanol 80% + Água 20%	Leucemia humana (K562)	Necrose* e Apoptose**	Ativação da RIPK1 e aumento da caspase 3	BONAMIGO <i>et al.</i> , 2017
<i>Trigona incisa</i>	Cardol (5-pentadecil resorcinol)	Adenocarcinoma de colón (SW620)	Apoptose	Aumento da atividade da caspase 3 e 9, depolarização mitocondrial, aumento de ROS, reversão parcial da apoptose com NAC	KUSTIAWAN <i>et al.</i> , 2017
<i>Scaptotrigona bipunctata</i> ; <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Hidroetanólico = Etanol 70% + Água 30%	Melanoma humano (SK-MEL-28)	Apoptose	Redução do potencial de membrana mitocondrial,	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018

				diminuição de BCL-2	
<i>Heterotrígona itama</i>	Etanólico	Carcinoma cervical humano (HeLa)	Apoptose	NE	MOHD-YAZID <i>et al.</i> , 2018
<i>Tetragonula biroi</i>	Etanólico	Câncer gástrico (AGS, MKN-45, NUGC-4)	Apoptose	Modulação positiva da transcrição de BAX e BAD, modulação negativa de BCL2L1 e BCL-2	DESAMERO <i>et al.</i> , 2019
<i>Trigona spp.</i>	Hidroetanólico = Etanol 70% + Água 30%	Linhagem celular de câncer de mama (MCF7)	Apoptose	NE	AMALIA <i>et al.</i> , 2020

NE: não estudado. *Principalmente. **Parcialmente.

FONTE: adaptado de CAMPOS *et al.*, 2021

3.6.1.2. Interferências na sinalização oncogênica

Vias de sinalização como RAS e PI3K também podem ser afetadas por mutações e contribuir para o desenvolvimento de câncer em humanos (VOGELSTEIN *et al.*, 2013).

A proteína RAS faz parte da família MAPK de proteínas, constituída por diversos membros que apresentam papéis cruciais na sinalização intracelular. A ativação de RAS ocorre mediante a associação de ligantes (agonistas) em receptores de membrana (RTK) ou em receptores *G-protein-coupled* (GPCR), culmina na ativação de RAF, ambas com potencial oncogênico. Essas proteínas possuem a função de sinalizar para as demais MAPK o início e interrupção das funções celulares exercidas pela via, atuando como reguladores do processo de transcrição (DELIRE; STÄRKEL, 2015; ROBERTS; DER, 2007; KOLCH, 2000).

Além da atuação na via MAPK mediada por ERK 1/2, RAS também pode iniciar e regular as atividades de outras vias por ser ativada por fatores extracelulares distintos, como os fatores de crescimento. Um exemplo é a ação na via mTOR pela fosforilação da PI3K (MINH *et al.*, 2005). Durante a carcinogênese, alterações que incluem perdas de fosfatases lipídicas (PTEN e INPP4B) e mutações em genes que codificam subunidades catalíticas, reguladoras e/ou ativadoras de PI3K e AKT, levam a uma ativação exacerbada dessa via (POLIVKA JR; JANKU 2014; DANIELSEN *et al.*, 2015), resultando no crescimento e na diferenciação celular, na angiogênese, na

inibição da apoptose (VOGELSTEIN *et al.*, 2013; DANIELSEN *et al.*, 2015) e na indução de metástases (LIU *et al.*, 2012).

Tem sido relatado que o própolis pode atuar em diversas etapas de diferentes vias de sinalização, acarretando na modulação de reguladores do ciclo celular, tais como ciclina D, cinases dependentes de ciclina (Cdk-2/4/6) e inibidores de cinase dependentes de ciclina, e impedindo a progressão do ciclo nas células tumorais (SEPÚLVEDA *et al.*, 2019; CHIU *et al.*, 2020).

Ainda, foi verificado que o ácido caféico, um composto identificado em vários tipos de própolis, consegue inibir a proteína quinase ribossomal S6 beta-1 (p70S6K), um intermediário responsável pela síntese de proteínas na via PI3K/AKT e algumas redes de sinalização AKT, levando à inibição da proliferação de células de câncer de próstata LNCaP, DU-145 e PC-3 (ZABAIYOU *et al.*, 2017).

3.6.1.3. Mecanismos de regulação do ciclo celular

Em geral, a proliferação de células envolve um processo chamado ciclo celular (IMOTO *et al.*, 2011). Basicamente, a progressão deste ciclo está associada a fases específicas que ocorrem nos períodos de interfase e mitose (LEAL-ESTEBAN, FAJAS, 2020). Após sair da fase G0 (quiescência), as células entram na interfase, que é sequencialmente dividida em 3 fases: G1 (crescimento celular), S (síntese de DNA) e G2 (preparação para mitose), para entrar então, no período de mitose ou fase M, onde ocorre a distribuição igual de material genético e citocinese (SEPÚLVEDA *et al.*, 2019; OTTO, SICINSKI 2017).

A progressão do ciclo celular é regulada pela ação conjunta de cinases dependentes de ciclina (CDKs) e proteínas que controlam sua ativação e especificidade de substrato, chamadas de ciclinas (LIM, KALDIS, 2013). As CDKs são enzimaticamente ativas e participam dos seguintes processos: (I) interação com ciclinas para formar complexos heterodiméricos ativos e (II) fosforilação de resíduos de treonina presentes em seu segmento de ativação (ROSKOSKI, 2019; LEAL-ESTEBAN, FAJAS 2020). Em mamíferos, as principais CDKs envolvidas no ciclo celular são CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6, que formam complexos enzimáticos ativos

com ciclinas específicas (CAMPOS *et al.*, 2021). A atividade das CDKs que contribuem para o avanço do ciclo celular é induzida por sinais mitogênicos, e inibida pela ativação de *checkpoints* do ciclo celular, que respondem a falhas de integridade genética (OTTO, SICINSKI 2017).

Além disso, a progressão do ciclo celular é bloqueada pela ação supressora tumoral das proteínas do retino blastoma (pRb) e p53 (ENGELAND, 2017), e pela ação de inibidores endógenos de cinases dependentes de ciclina (CKIs), que controlam a atividade de CDKs (KARIMIAN *et al.*, 2016). Em geral, os CKIs promovem a parada do ciclo celular (LEAL-ESTEBAN, FAJAS 2020) e desempenham um papel crítico na regulação do ciclo celular (QIN *et al.*, 2020). Assim, antes de retornar ao processo de divisão, possíveis danos ao material genético podem ser reparados, ou células severamente danificadas são eliminadas via apoptose (SANTO *et al.*, 2015).

Desta forma, o ciclo celular é um processo altamente regulado e ordenado devido à cooperação rigorosa entre CDKs, ciclinas e CKIs (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019). No entanto, em células tumorais, os níveis dessas proteínas são frequentemente desregulados devido a mutações e expressão anormal de genes do ciclo celular (LEAL-ESTEBAN, FAJAS 2020). Essas mutações inativam CKIs e hiperativam CDKs (SANTO *et al.*, 2015). Com a desativação de seus mecanismos inibitórios, o ciclo e a proliferação celular ocorrem de forma incontrolável (LEAL-ESTEBAN, FAJAS 2020). Assim, os inibidores de CDKs são uma alternativa de tratamento para o câncer, e um dos focos de pesquisas relacionadas, é o desenvolvimento de fármacos direcionados ao ciclo celular e à transcrição de CDKs (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

A Tabela 3 mostra as interferências e os mecanismos moleculares de própolis de abelhas sem ferrão e seus compostos, relacionados ao controle e progressão do ciclo celular em várias linhagens tumorais.

TABELA 3 - Efeito *in vitro* de própolis de abelhas sem ferrão e seus compostos isolados, no ciclo celular de linhagens tumorais.

Espécies de abelhas sem ferrão	Tipo de extrato ou composto isolado	Linhagem celular	Efeitos no ciclo celular	Mecanismos envolvidos	Referências
<i>Trigona incisa</i>	Metanólico fracionado (acetato de etila e hexano)	Adenocarcinoma de colón (SW620)	Parada no ciclo celular (fase G1)	NE	KUSTIAWAN <i>et al.</i> , 2015
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Hidroetanólico = Etanol 70% + Água 30%	Melanoma humano (SK-MEL-28)	Parada no ciclo celular (fase G2/M)	NE	CISILOTTO <i>et al.</i> , 2018
<i>Tetragonula biroi</i>	Etanólico	Câncer gástrico (AGS, MKN-45, NUGC-4)	Parada no ciclo celular (fase G0/G1)	Modulação positiva da transcrição de genes inibitórios do ciclo celular (CDKN1A, CDKN1B, tp53), modulação negativa por transcrição de CDK1, CDK2 e CCND1 relacionadas com quinases e ciclinas	DESAMERO <i>et al.</i> , 2019

NE: não estudado.

FONTE: adaptado de CAMPOS *et al.*, 2021

3.6.1.4. Migração, invasão e angiogênese

Os processos de migração, invasão e angiogênese são etapas fundamentais do processo metastático (GUAN, 2015). Nesse sentido, tem sido evidenciado que própolis e alguns de seus compostos, podem atuar inibindo a ocorrência de qualquer uma dessas etapas, como descrito a seguir.

Por exemplo, tem sido evidenciado que o ácido caféico (CAPE) isolado de própolis inibe a migração e a invasão de diferentes linhagens de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468), de colón (SW620, CT26) e de pulmão (H460) por meio de mecanismos que incluem a diminuição significativa da expressão de reguladores da migração e invasão como vimentina, MMP-2, MMP-9, β -catenina, TGF β e Wnt 3 α ; bloqueio da atividade do canal sódio dependente de voltagem (VGSC) e inibição da secreção de MMP-2 e MMP-9 (WADHWA *et al.*, 2016, FRASER *et al.*, 2016, LIAO *et al.*, 2003). Ainda, Wu e colaboradores (2011) verificaram que o CAPE diminui em 90% a secreção de VEGF em células de câncer de mama MDA-MB-231, quando aplicado na concentração de 40 μ M, mostrando que esse composto é capaz de evitar a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) sob normóxia e hipóxia.

Wang e Tang (2017) sugeriram que própolis e seu componente galangina consegue modular a capacidade das células de câncer de laringe (TU212 e M4e) de migrar e invadir tecidos através da inibição das vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT.

3.6.2. Própolis como adjuvante em terapias

Uma das perspectivas mais promissoras em relação ao uso de própolis no câncer tem sido utilizá-lo como elemento complementar à terapia, para potencializar a atividade de fármacos antitumorais e prevenir os efeitos colaterais dos esquemas de quimioterapia e radioterapia (SEPÚLVEDA *et al.*, 2019). Tais ações exercidas por própolis e seus compostos isolados, estão descritas na Tabela 4.

TABELA 4 - Efeito *in vivo* adjuvante e/ou paliativo de própolis e seus compostos isolados em modelos experimentais para o estudo do câncer.

Tipo de estudo	modelo tumoral / animal	Indução do câncer	Regime terapêutico	Tratamento com Própolis e via de administração	Principais resultados	Referências
Própolis como adjuvante/paliativo à quimioterapia	Camundongos CBA - machos e fêmeas	Injeção i.v. de 10 ⁶ células de carcinoma mamário Mca	Epirrubicina administrado i.v. em doses de 2,5 mg/kg 2 dias após a inoculação das células tumorais	2 dias após a inoculação das células tumorais, doses de 50 e 150 mg/kg 1x ao dia via i. g. ou i.p., durante 3 dias consecutivos - os camundongos foram mortos 21 ou 40 dias após o tratamento	WSDP e Epirrubicina inibiram a metástase no pulmão. O própolis aumentou o número de UFCs, celularidade do tecido hematopoiético e número de leucócitos periféricos; tratamento prolongado elevou os tipos mieloides e megacariocíticos de UFCs	ORSOLIC; BASIC, 2005
	Ratos <i>Sprague Dawley</i> - fêmeas	Administração de 20 mg de DMBA ao coxim adiposo mamário por "técnica de bolsa de ar"	Paclitaxel administrado i.p. em doses de 33 mg/kg 1x por semana por 4 semanas	Administração oral de 50 mg/kg/dia imediatamente após o tratamento carcinogênico durante 30 dias	EEP e paclitaxel preveniram o aumento de enzimas cancerígenas, citocromo P(450), citocromo b(5) e NADPH citocromo C redutase	PADMAVATHI <i>et al.</i> , 2005
	Ratos <i>Swiss</i> albinos - machos	Injeção i.p. de 10 ⁶ de células de carcinoma ascítico de Ehrlich	Irinotecano foi administrado i.p. em doses de 50 mg/kg nos dias 1, 13 e 19.	Administração i. p. de WSDP e EEP a 100 mg/kg/dia por 3 dias consecutivos, começando no 3º dia após a injeção de células EAT. O experimento terminou no dia 90.	WSDP e EEP juntamente com IRI aumentaram significativamente a vida útil, tendo menor número de células tumorais e maior contagem de macrófagos e neutrófilos na cavidade peritoneal, diminuindo os níveis de dano primário ao DNA no fígado, rim e células ascíticas	LISICIC <i>et al.</i> , 2014
	Ratos <i>Swiss</i> albinos - machos	Injeção i.p. de 2x10 ⁶ de células de carcinoma ascítico de Ehrlich	3 dias após a inoculação, a hipertermia foi induzida via i.p. com 4 mL de soro fisiológico à 43°C. A cisplatina foi aplicada após a hipertermia em doses de 5 e 10 mg/kg	Administração i.p. de WSDP administrado 7 e 3 dias antes da inoculação de células tumorais a 50 mg/kg	O própolis reduziu o efeito tóxico e genotóxico da cisplatina em células normais sem afetar as células EAT. Além disso, própolis + hipertermia aumenta as ações citotóxicas de macrófagos contra células tumorais	ORSOLIC <i>et al.</i> , 2013
	Ratos <i>Winstar</i> - fêmeas	-	e/ou vimblastina (2 mg/kg) foram administradas via i.p.. Após 24 h da aplicação da droga, os ratos foram sacrificados.	Administração via oral de EMEPA 100 mg/kg/dia e 10 ⁻⁴ PCQE via i.p. 4 dias antes do tratamento com neoplásicos.	O própolis reduziu o dano peroxidativo induzido pelo tratamento com doxorubicina e vimblastina e restaurou as atividades teciduais de catalase e SOD no miocárdio e fígado	BENGUEDOUAR <i>et al.</i> , 2008
Própolis como adjuvante/paliativo à radioterapia	Ratos <i>Winstar</i> - fêmeas	-	A radioterapia foi aplicada no crânio total por fração única na dose de 18 Gy	Aplicação tópica de própolis (SND) a 50 e 100 mg/kg/dia. A primeira dose foi administrada 30 min antes da irradiação e as demais doses após a irradiação 1x ao dia por 7 dias	Diminuição do peso corporal e contagem de neutrófilos, e aumento da mucosite oral ocorreu no grupo Radioterapia. O própolis mostrou uma normalização dose-dependente nesses parâmetros	BERDERLI; DENIZ, 2011
	Camundongos CBA - machos	-	Irradiação com radiação gama ⁶⁰ Co na dose de 4 e 9 Gy	Administração i.p. de EEP na dose diária de 100 mg/kg por 3 dias consecutivos antes (grupo preventivo) ou após irradiação (grupo paliativo)	O própolis protegeu camundongos dos efeitos letais da irradiação e diminui os danos primários ao DNA em seus glóbulos brancos, especialmente no grupo preventivo	BENKOVIC <i>et al.</i> , 2008
	Ratos <i>Winstar</i> - fêmeas	-	A radiação gama com ⁶⁰ Co foi aplicada no crânio total a uma taxa de dose de 15 Gy por 7 minutos e 39 segundos	Administração via i.p. de 400 mg/kg/dia de própolis (SND) por 3 dias, antes da irradiação	O própolis diminui a intensidade da mucosite e teve efeitos protetores sobre a função das glândulas salivares no terceiro dia, mas não aos 70 dias. O própolis não preveniu alterações histológicas induzidas por radiação nos tecidos da glândula parótida	MOTALLEBNEJAD <i>et al.</i> , 2014
	Ratos <i>Winstar</i> - machos	-	Irradiação com radiação gama ⁶⁰ Co na dose de 15 Gy por 7 - 9 minutos	Administração via i.p. de WEP a 100, 200 e 400 mg/kg desde o dia da radiação que continuou por 10 dias consecutivos	O própolis retardou a incidência e a gravidade da mucosite induzida pela radiação gama e também preveniu a redução dos níveis de antioxidantes salivares nos ratos irradiados	MOTALLEBNEJAD <i>et al.</i> , 2014

Abreviações: i.v, intravenoso; i.p, intraperitoneal; i.g, intragastrico; WSDP, derivado de própolis solúvel em água; EPP extrato etanólico de própolis; EMEP, extrato metanólico e etanólico de própolis; DMBA, 2,4-DimetoxibenzaldeídoMDA, malondialdeído; SND, solvente não definido; SOD superóxido dismutação; CFUs, unidade de formação de colônias.

FONTE: adaptado de SEPÚLVEDA *et al.*, 2019

Apesar de existirem estudos que demonstram o potencial antitumoral de própolis e seus compostos, bem como a ação destes produtos na potencialização do efeito promovido por quimioterápicos, estes se limitam, em sua maioria, à investigação de própolis de *Apis mellifera* (abelha com ferrão). Os mecanismos moleculares envolvidos na mediação destes efeitos, bem como o efeito da associação de quimioterápicos a própolis de abelhas sem ferrão, são ainda pouco explorados.

Desta forma, este trabalho pretende elucidar alguns mecanismos envolvidos na sensibilização de células tumorais pelo extrato de própolis de abelhas sem ferrão *Tetragona clavipes* a ação de fármacos quimioterápicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA E OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DA ABELHA *Tetragona clavipes*

O própolis bruto de *Tetragona clavipes* foi coletado na região de Tamarana - PR (23°53'58,47"S, 51°00'48,29"W) durante a primavera do ano de 2018. O própolis bruto coletado (cerca de 30 g) foi colocado em um frasco contendo 300 mL de etanol absoluto por 72 h, tendo sido o frasco agitado três vezes por dia, nesse intervalo de tempo. O macerado obtido foi centrifugado (1800g por 15 min), resultando na obtenção de uma porção líquida (sobrenadante) e um resíduo sólido (cera). A porção líquida foi armazenada em geladeira (~8°C), enquanto o resíduo sólido foi novamente macerado conforme descrito anteriormente. Posteriormente, a cera foi descartada, e as porções líquidas foram misturadas e colocadas a temperatura de -20°C para precipitação da cera residual. O sobrenadante foi centrifugado (1800g por 15 min) e submetido a destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo, até eliminação total do solvente, dando origem ao extrato etanólico (BORÁ). Por fim, para a realização dos ensaios *in vitro*, foi preparada uma solução estoque de BORÁ, a partir da diluição de 100 mg do extrato de própolis, em 1 mL de DMSO (concentração final de 100 mg/mL). A solução estoque foi filtrada em membrana de 0,22 µm e armazenada a -30°C até o momento da realização dos experimentos.

Cabe ressaltar que o extrato de própolis utilizado neste estudo foi produzido e gentilmente cedido pela doutoranda Monica Surek do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPR.

Previamente a execução deste trabalho, registrou-se o uso do própolis para as investigações aqui descritas, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente do Brasil sob protocolo nº AAC72B0.

4.2. CULTURA E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular não tumoral McCoy (fibroblastos murinos) foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz; já a linhagem não tumoral L929 (fibroblastos murinos) foi obtida

do ATCC (*American Type Culture Collection*). As linhagens tumorais MDA-MB-231 (carcinoma de mama), HRT-18 (carcinoma colorretal), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB - 10%), penicilina-G (100 U/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) e bicarbonato de sódio. Para o cultivo de células L929 e MDA-MB-231 adicionou-se ao meio de cultivo, L-glutamina (2 mM).

As culturas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C e em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

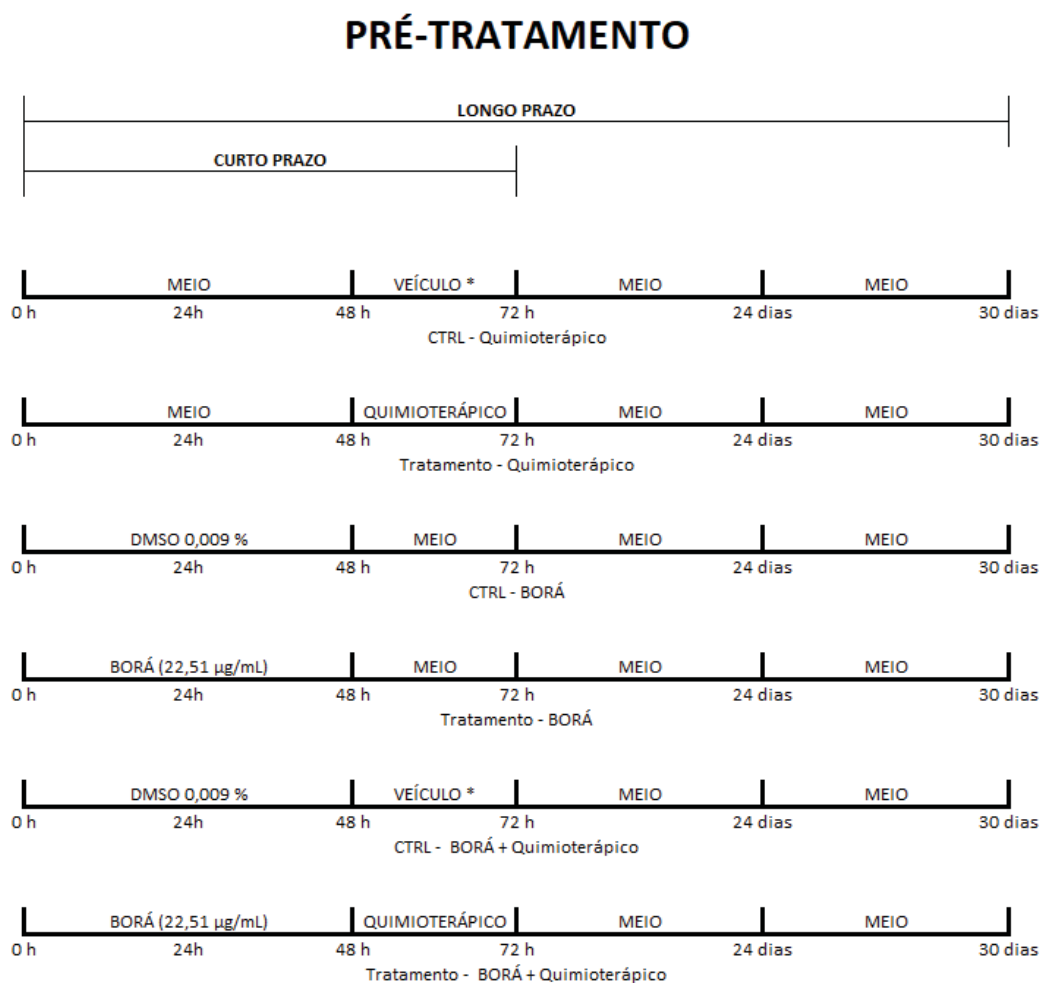
A manutenção celular era realizada toda vez que a confluência de células atingisse 80% da área total de aderência da garrafa de cultivo celular.

4.3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL ADOTADA PARA O ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS DE ABELHA BORÁ À QUIMIOTERÁPICOS

Para verificar se o extrato de Borá seria capaz de sensibilizar seletivamente células MDA-MB-231 ao efeito citotóxico de quimioterápicos, potencializando a ação dos mesmos, foram adotados os esquemas de tratamento descritos a seguir:

(I) Pré-tratamento: as células foram expostas ao extrato de Borá na concentração referente ao CI_{50} (22,51 $\mu\text{g/mL}$) por 48 horas, seguida da adição de doxorrubicina (1,56 – 50 ηM), paclitaxel (3,2 – 102,4 μM) ou 5-fluorouracil (0,125 – 4 μM) por 24 horas, totalizando 72 horas de tratamento.

FIGURA 4 - Esquema do pré-tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com a associação de própolis de abelha Borá aos agentes quimioterápicos doxorrubicina, paclitaxel e 5-fluorouracil.

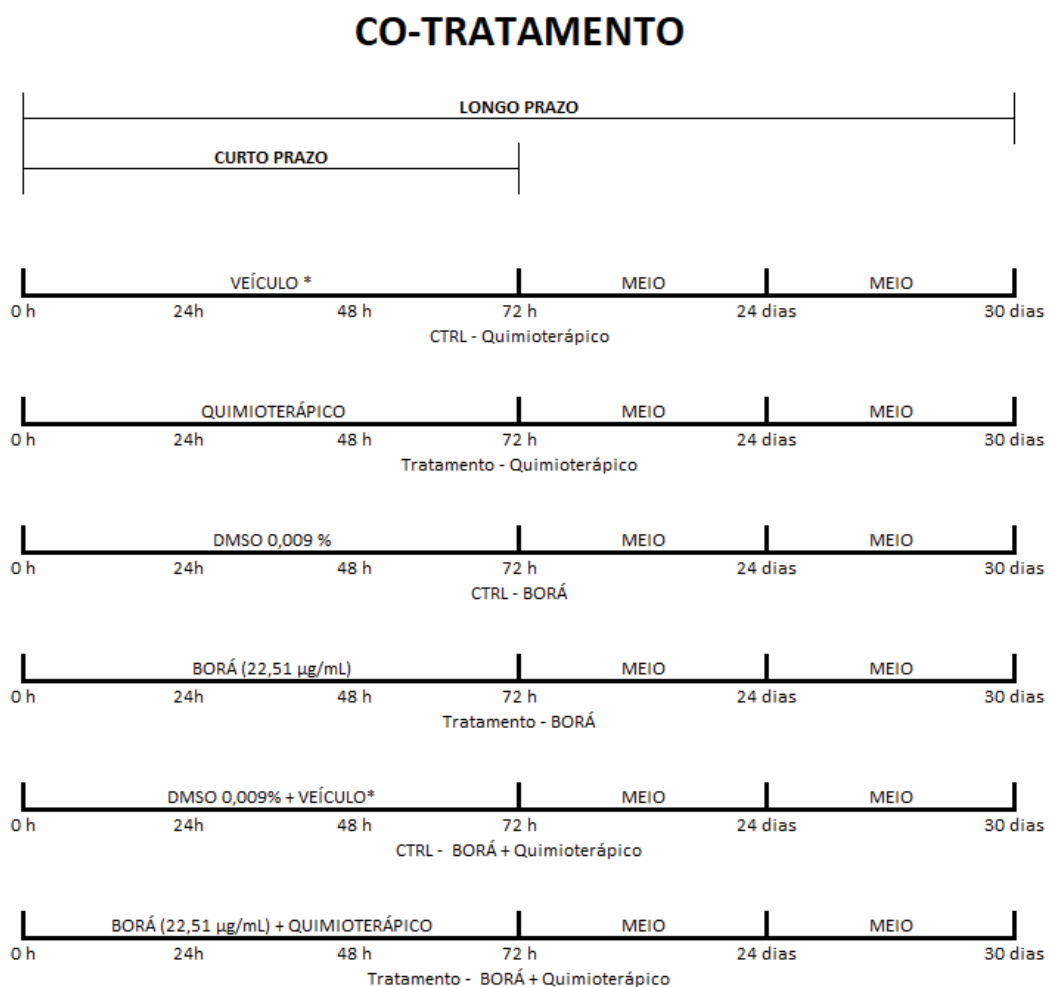


Veículo* = Para o tratamento com doxorrubicina = PBS 0,07%; paclitaxel = DMSO 0,062%; 5-FU = DMSO 0,006%.

FONTE: A autora (2022).

(II) Co-tratamento: as células foram tratadas concomitantemente com o extrato de Borá (22,51 µg/mL) e com os quimioterápicos doxorrubicina (1,56 – 50 ηM), paclitaxel (3,2 – 102,4 µM) ou 5-fluorouracil (0,125 – 4 µM) por 72 horas.

FIGURA 5 - Esquema do co-tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com a associação de própolis de abelha Borá aos agentes quimioterápicos doxorrubicina, paclitaxel e 5-fluorouracil.

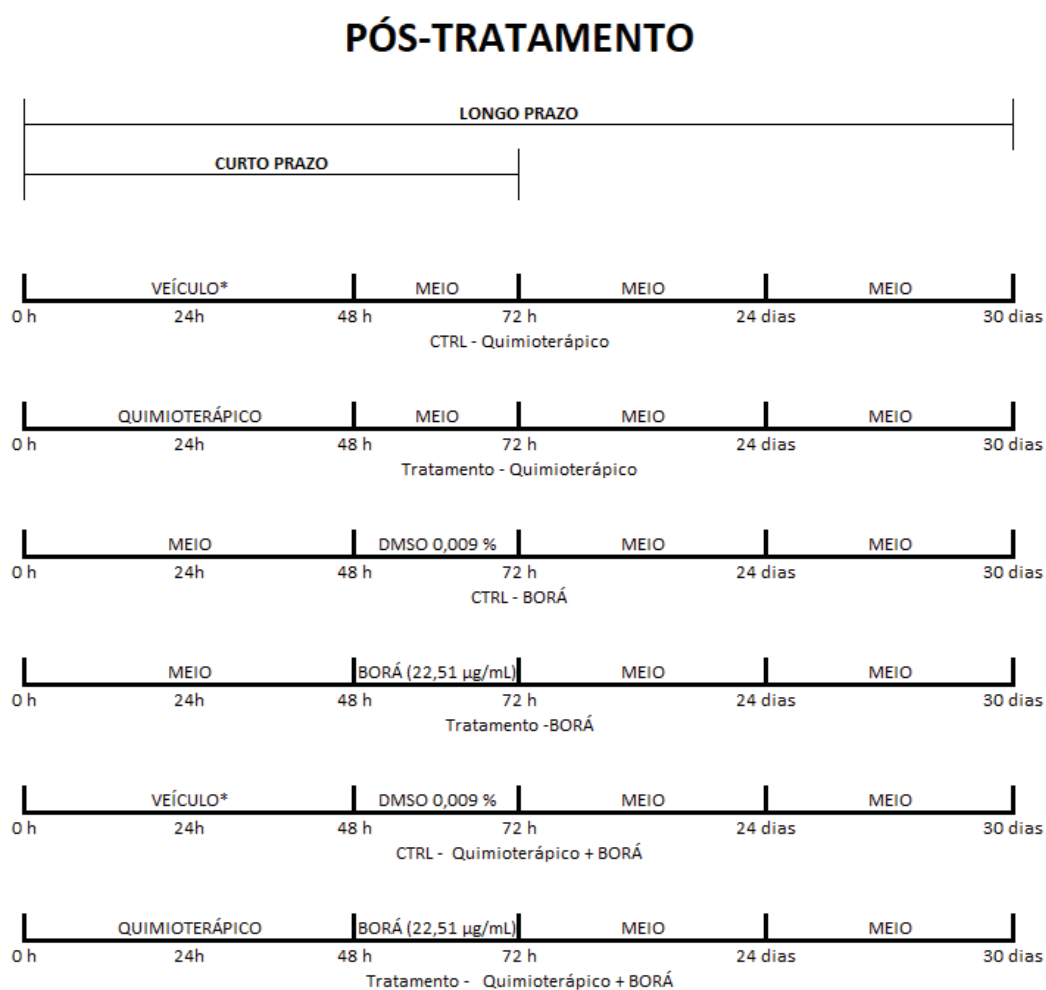


Veículo* = Para o tratamento com doxorrubicina = PBS 0,07%; paclitaxel = DMSO 0,062%; 5-FU = DMSO 0,006%.

FONTE: A autora (2022).

(III) Pós-tratamento: as células foram tratadas com os quimioterápicos doxorrubicina (1,56 – 50 η M), paclitaxel (3,2 – 102,4 μ M) ou 5-fluorouracil (0,125 – 4 μ M) por 48 horas, seguida da adição do extrato de Borá (22,51 μ g/mL) por 24 horas, totalizando 72 horas de tratamento.

FIGURA 6 - Esquema do pós-tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com a associação de própolis de abelha Borá aos agentes quimioterápicos doxorrubicina, paclitaxel e 5-fluorouracil.



Veículo* = Para o tratamento com doxorrubicina = PBS 0,07%; paclitaxel = DMSO 0,062%; 5-FU = DMSO 0,006%.

FONTE: A autora (2022).

Para todos os esquemas, as análises de efeito imediato (MTT, verificação de alterações na permeabilidade e integridade de membrana e avaliação de interferências na migração celular) foram realizadas após 72 h de tratamento. Os ensaios a longo prazo (ensaio clonogênico e *cumulative population doubling*) foram realizados após a retirada dos tratamentos e substituição por meio de cultivo livre de própolis, quimioterápicos e compostos, levando-se em consideração suas especificações como descrito nos itens 4.7 e 4.8.

Ainda, é importante ressaltar que, uma vez que os controles referentes aos tratamentos com quimioterápicos (CTRL-Quimioterápico) e Borá (CTRL-BORÁ) apresentaram citotoxicidade semelhante e sem diferença estatística a apresentada pelo controle relacionado as associações (CTRL- Quimioterápico + BORÁ), para a realização dos ensaios, com exceção do MTT, suprimiu-se esses dois controles, utilizando como controle único o CTRL- Quimioterápico + BORÁ.

4.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) seguindo protocolo adaptado de Mosmann (1983).

Células das linhagens McCoy, L929, MDA-MB-231, HRT-18, HeLa e HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços. Para os experimentos de 24 h, as células foram semeadas na densidade de 5.000 células/ poço; já para os experimentos de 48 e de 72 h, as células foram semeadas na densidade de 2000 células/poço.

A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de 24h para a adesão celular. Em seguida, em cada poço foi acrescentado o extrato de Borá em diferentes concentrações (25 – 300 µg/mL para os tratamentos de 24 h e 48 h; e de 10 - 200 µg/mL para tratamentos de 72 h). O controle foi tratado com veículo (DMSO na concentração de 0,06% para o tratamento de 24 h e 48 h e de 0,04% para o tratamento de 72 h).

As placas foram incubadas em estufa nas mesmas condições de temperatura e CO₂ supracitadas, por mais 24, 48 ou 72 h. Finalizado o tratamento, o conteúdo líquido dos poços foi retirado e os mesmos foram lavados com PBS, para então ser adicionada 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, sendo adicionados 100 µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan. As placas foram homogeneizadas e lidas na absorbância de 570 nm em espectrofotômetro. Este teste foi realizado em triplicata com 4 repetições para cada concentração.

Para determinar o percentual de viabilidade celular após o tratamento com o extrato de Borá em cada uma das concentrações, considerou-se os valores de absorbância apresentados pelo controle como 100% de viabilidade celular.

O valor de concentração inibitória mínima (CI₅₀) para cada linhagem celular tratada com o extrato de Borá foi determinado utilizando-se o software GraphPad Prisma (San Diego, EUA).

O índice de seletividade (IS) foi calculado segundo Badisa *et al.*, 2009, dividindo-se o valor de CI₅₀ da célula não tumoral pelo CI₅₀ das células tumorais, conforme equação descrita a seguir:

$$IS = \frac{\text{CI}_{50} \text{ do extrato na célula não tumoral}}{\text{CI}_{50} \text{ do extrato na célula tumoral}}$$

Valores de IS superiores a 1 foram considerados como indicativos de citotoxicidade seletiva (BARTMAŃSKA *et al.*, 2018).

Para a avaliação do efeito citotóxico causado pela associação do extrato de Borá a quimioterápicos utilizados na clínica para o tratamento do câncer de mama, células L929 e MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 96 poços, em uma densidade de 5.000 células/poço, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por cerca de 24 h para a adesão celular.

A seguir, aos poços foram adicionados extrato de Borá (22,51 µg/mL), DOXO (1,56 – 50 nM), PACLI (3,2 – 102,4 µM) e 5-FU (0,125 – 4 µM), isoladamente ou em associação, conforme os três esquemas presentes no item 4.3 por 72 h. Em seguida, prosseguiu-se a execução do ensaio do MTT conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade celular, em relação ao grupo controle, sendo atribuído a este a viabilidade de 100%.

Para comparar o efeito global na viabilidade celular induzido pelas associações ao efeito promovido por BORÁ e pelos quimioterápicos aplicados isoladamente, foram construídas curvas de concentração-resposta para determinação da área sob a curva (AUC), as quais foram calculadas com o auxílio do software GraphPad Prisma (San

Diego, EUA).

Este teste foi realizado em triplicata com 4 repetições para cada concentração.

4.5. ENSAIO DE INTEGRIDADE E PERMEABILIDADE DE MEMBRANA

O ensaio para se indicar o tipo de morte celular causada pelo tratamento com extrato de Borá, 5-FU e a associação BORÁ + 5-FU foi realizado por meio da coloração concomitante com iodeto de propídeo e laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995).

Para isso, células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 6 poços, em uma densidade de 58.180 células/poço, e mantidas em estufa por 24 h. Após adesão, as células foram tratadas com BORÁ (22,51 µg/mL) e/ou com 5-FU (1 µM) conforme esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3. A seguir, as células foram tripsinizadas, ressuspendidas em 50 µL de PBS e incubadas com 10 µL de iodeto de propídeo (100 µg/mL) e 10 µL de laranja de acridina (100 µg/mL), ao abrigo da luz por 15 minutos, antes da leitura em microscópio de fluorescência.

Foram capturadas imagens das células em campos aleatórios, obtidas com o uso de dois filtros diferentes, um para cada agente fluorescente, com comprimentos de onda entre 460-650 nm para laranja de acridina e 525 - 595 nm para iodeto de propídeo. As imagens geradas foram sobrepostas utilizando-se o software ImageJ FIJI. Foram analisadas 300 células em cada uma das amostras.

As células foram classificadas como viáveis (verdes), apresentando alterações na permeabilidade de membrana (amarelas) e apresentando a membrana rompida (vermelhas). Esse ensaio foi realizado em triplicata.

4.6. ENSAIO DE MIGRAÇÃO (*Wound Healing*)

Para avaliação da migração celular foi realizado o ensaio *wound healing*, baseado em protocolo descrito por Burk e colaboradores (1973), com modificações. Células MDA-MB-231 foram semeadas na densidade de 190.000 células/poço, em placas de 24 poços, em meio RPMI 1640 suplementado com 2,5% de SFB. As placas

foram incubadas por 24 h para a adesão celular, e formação de uma monocamada com confluência acima de 90%. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 100 μ L, células foram removidas da monocamada, de modo a formar uma fenda vertical no centro dos poços. Os poços foram lavados 2x com PBS para retirada dos fragmentos celulares dissociados mecanicamente. A seguir, as células foram tratadas com BORÁ (22,51 μ g/mL) e 5-FU (0,25 – 2 μ M) de forma isolada ou associada, conforme o esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3.

O processo de migração celular foi acompanhado com o auxílio de um microscópio invertido (Bioval, serie XDS-1B), e registrado por meio de imagens obtidas nos tempos 0, 48 e 72 h de exposição das células aos tratamentos. A área da fenda foi mensurada utilizando-se o software ImageJ. A área do tempo 0 foi considerada como 100% de inibição de migração, tendo sido atribuídos valores percentuais em relação ao tempo 0 para a média das áreas mensuradas nos tempos de 48 e 72 h. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7. ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico foi realizado seguindo protocolo proposto por Franken e colaboradores (2006). Células L929 e MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de 11.700 células/poço e incubadas em estufa pelo período de 24 h. A seguir, as células foram tratadas com extrato de Borá (22,51 μ g/mL) e 5-FU nas concentrações de 0,25 - 2 μ M, aplicados de forma isolada ou associada, conforme o esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3 por 72 h.

Após o tratamento, retirou-se o meio de cultura dos poços e realizou-se a tripsinização para liberação das células. Em seguida, em cada poço, foram ressemeadas 100 células em meio de cultivo, agora livre de extrato de própolis, quimioterápico e/ou veículo. As placas foram novamente incubadas em estufa, até verificação da formação de colônias. Uma vez visualizadas colônias no grupo controle, realizou-se a revelação do ensaio.

Para isso, as colônias foram fixadas com metanol 70% e a seguir, coradas com uma solução de cristal violeta 0,2%. Finalmente, com o auxílio de um celular, imagens foram capturadas e analisadas pelo software SchieferCounter desenvolvido e descrito por Santos e colaboradores (2020). Os resultados foram expressos em

número de colônias, área total ocupada pelos clones, bem como foi realizada a classificação dos clones conforme seu tamanho (pequenos, médios e grandes). Foram consideradas colônias pequenas, médias e grandes aquelas que apresentaram tamanho entre 0 – 500 pixels, 501 – 1000 pixels, e 1001 – 1500 pixels, respectivamente.

A redução do número de colônias, independentemente de seu tamanho, foi interpretada como a capacidade de os tratamentos em interferir na adesão celular. Já a estratificação das colônias pelo seu tamanho foi utilizada para avaliar a indução, bem como a magnitude de efeito antiproliferativo. Nesse sentido, a elevação do número de clones pequenos, bem como a redução de clones médios e/ou grandes, foi considerada indução de efeito antiproliferativo. Por fim, interferências na área total ocupada pelos clones foram interpretadas como efeito anticlonogênico associado a redução da adesão celular e/ou de atividade citostática. Todos os parâmetros avaliados foram normalizados pelos valores dos respectivos controles normais (CTRL). Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.8. ENSAIO CPD (*Cumulative Population Doubling*)

O ensaio CPD foi realizado seguindo protocolo estabelecido por Silva e colaboradores (2016) com adaptações. Células L929 e MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de 11.700 células/poço e incubadas em estufa pelo período de 24 h. A seguir, as células foram tratadas com BORÁ (22,51 μM) e 5-FU nas concentrações de 0,25 - 2 μM , adicionados de forma isolada ou associada, conforme o esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3 por 72 h.

Posteriormente o tratamento, as células presentes nos poços foram tripsinizadas e contadas. Um volume de suspensão celular foi ressemado e incubado em cada um dos poços, os quais continham meio de cultivo fresco. Para estabelecer o volume de células a serem ressemadas e incubadas, determinou-se primeiramente, o número de células que correspondesse a aproximadamente 10% de confluência, considerando-se o número apresentado pelo controle como 100% de crescimento. Uma vez estabelecido este valor, determinou-se o volume de suspensão celular a ser ressemado e incubado tomando como base o tratamento mais efetivo no ensaio do MTT (BORÁ 22,51 $\mu\text{g/mL}$ + 5-FU 2 μM), o qual poderia apresentar menor

adesão celular em comparação aos demais tratamentos, tendo em vista a significativa citotoxicidade induzida pelo mesmo. Os procedimentos de tripsinização, contagem e ressemeadura foram repetidos conforme descrito anteriormente, sempre que algum dos poços atingisse confluência entre 70 – 90%, possibilitando a determinação de uma curva de crescimento, que se estendeu por 27 dias após a primeira contagem.

O índice de crescimento da população celular foi calculado conforme a equação descrita a seguir:

$$PD = \frac{\text{Ln (FN)} - \text{Ln (IN)}}{\text{Ln (2)}}$$

O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos determinando-se o CPD final relativo (RendCPD), a taxa de proliferação celular (RPR), o tempo relativo para alcançar um determinado CPD (RTCT), bem como a área sob a curva (AUC) de cada uma das curvas de crescimento obtidas. A AUC foi determinada utilizando-se o software GraphPad Prisma (San Diego, EUA).

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão das triplicatas de cada experimento. Os dados foram analisados usando ANOVA *oneway* (análise de variância unidirecional), seguido pelo teste de Bonferroni. Para avaliar a seletividade entre células de um mesmo tratamento, foi realizado o Teste t. Os resultados foram considerados significativos para as análises em que obteve-se $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas desse trabalho foram determinadas com o software GraphPad Prisma (San Diego, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO DE BORÁ

Própolis vêm apresentando significativo efeito citotóxico e antiproliferativo em diversas linhagens celulares (FORMA; BRYS, 2021) e em modelos experimentais animais (ZINGUE *et al.*, 2020). Dentre os tipos de própolis mais estudados quanto ao seu potencial antitumoral, destacam-se aqueles produzidos pela espécie *Apis mellifera* (FRANCHIN *et al.*, 2018). Entretanto, própolis de abelhas sem ferrão também vem apresentando potencial citotóxico, antiproliferativo e antineoplásico significativo (CAMPOS *et al.*, 2021), os quais devem ser melhor explorados, uma vez que também podem constituir uma importante fonte de quimioterápicos, como é o caso do própolis avaliado nesse trabalho.

Para investigar o efeito do extrato do própolis de abelha Borá, foi primeiramente realizado um *screening* por meio da realização do ensaio do MTT com as linhagens celulares tumorais HRT-18, MDA-MB-231, HepG2 e HeLa e não tumorais McCoy e L929. Os resultados obtidos correspondentes ao CI_{50} estão representados na Tabela 5.

TABELA 5 - Citotoxicidade induzida pelo extrato etanólico da abelha Borá.

Linhagem Celular	Própolis de abelha Borá					5-Fluorouracil		
	24 Horas CI_{50}	48 Horas CI_{50}	72 Horas CI_{50}	IS McCoy	IS L929	72 Horas CI_{50}	IS McCoy	IS L929
McCoy	73,49 ± 2,91	54,28 ± 2,28 ^{***}	29,78 ± 1,54 ^{****}	-	-	1,88 ± 0,10	-	-
L929	NA	NA	32,86 ± 0,25	-	-	2,54 ± 0,11	-	-
HRT-18	95,06 ± 3,19	38,56 ± 2,19 ^{****}	24,02 ± 0,68 ^{***}	1,24	1,37	1,89 ± 0,12	0,99	1,34
MDA MB-231	80,82 ± 3,47	37,07 ± 1,59 ^{****}	22,51 ± 0,43 ^{***}	1,32	1,46	1,83 ± 0,08	1,02	1,39
HeLa	65,53 ± 1,78	45,86 ± 1,23 ^{****}	33,25 ± 1,72 ^{***}	0,91	0,99	2,07 ± 0,15	0,90	1,22
HepG2	126,8 ± 3,64	34,22 ± 2,06 ^{****}	24,57 ± 1,31 ^{**}	1,21	1,33	2,16 ± 0,22	0,87	1,17

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Valores de CI_{50} e índice de seletividade obtidos após o tratamento de células HRT-18, MDA-MB-231, HepG2, HeLa, McCoy e L929 com o extrato etanólico do própolis de abelha Borá (10 - 300 μ g/mL) ou 5-fluorouracil (0,5 - 32 μ M) pelo período de 24, 48 ou 72 horas. **, *** e **** representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente, em relação ao intervalo de tempo anterior. NA = não avaliado.

Pode-se observar que, de maneira geral, a citotoxicidade induzida pelo própolis Borá é tempo dependente, em todas as linhagens avaliadas. Logo, o efeito citotóxico do própolis foi mais evidente após 72 h de tratamento. As linhagens tumorais MDA-MB-231, a HRT-18 e a HepG2 foram igualmente susceptíveis a sua ação, não tendo sido observada diferença estatística entre os valores de CI_{50} determinados para as mesmas. A linhagem de menor susceptibilidade ao própolis foi a HeLa, que apresentou o maior valor de CI_{50} quando comparado aos valores das demais linhagens tumorais (Tabela 5).

Em relação ao tratamento com 5-FU, utilizado aqui como controle positivo de citotoxicidade no tempo de 72 h, pode-se observar que, em ordem crescente de susceptibilidade, as linhagens tumorais mais sensíveis a ação do fármaco foram: MDA-MB-231, HRT-18, HeLa e HepG2 (Tabela 5).

Dentre os compostos identificados em própolis e que apresentam atividade citotóxica sobre linhagens de carcinoma de mama, foco deste trabalho, pode-se citar os flavonoides miricetina, luteolina e galangina (OROIAN *et al.*, 2020) e principalmente o éster fenetil do ácido caféico (CAPE) (WU *et al.*, 2011). Ainda, derivados do CAPE têm sido sintetizados e vem demonstrando importante efeito citotóxico sobre linhagens de câncer mamário (BEAUREGARD *et al.*, 2015).

Por fim, em relação aos mecanismos de citotoxicidade determinados em células neoplásicas de mama, tem sido verificado que própolis e compostos isolados dos mesmos, podem atuar de diversas formas, seja inibindo vias relacionadas a proliferação e sobrevivência celular, como a via do NF κ B (YAN *et al.*, 2018), PI3K/AKT (FRIÓN-HERRERA *et al.*, 2019) e ERK 1-2 (COOK *et al.*, 2017); seja elevando a expressão de membros anti-apoptóticos e reduzindo a expressão de membros pró-apoptóticos da família bcl-2 (TANIDA *et al.*, 2012); ou elevando os níveis de p53 (ARU *et al.*, 2019); induzindo a ocorrência de estresse do retículo endoplasmático por meio da superexpressão de CHOP (ROZPEDEK *et al.*, 2016) e reduzindo os níveis intracelulares de ânion superóxido e de nitrito (HECHT *et al.*, 2016).

Em relação às linhagens não tumorais avaliadas após 72 h, pode-se verificar que a linhagem McCoy foi mais susceptível a ação do extrato de Borá quando comparada a linhagem L929. Conseqüentemente, tal diferença de susceptibilidade

acarretou valores de índice de seletividade inferiores para a linhagem McCoy, quando se compara estes aos valores obtidos para a linhagem L929. Entretanto, é possível verificar que, para ambos tipos celulares, as linhagens que apresentaram menor índice de seletividade foram HepG2 e HeLa, seguidas de HRT-18 e MDA-MB-231, a qual apresentou os maiores valores de IS (Tabela 5).

Os resultados obtidos corroboram alguns estudos, onde foi evidenciada ação citotóxica seletiva de própolis sobre linhagens tumorais, em detrimento de linhagens não tumorais. Em estudo realizado por De Oliveira e colaboradores (2014) foi verificada indução de efeito citotóxico seletivo do própolis verde sobre diversas linhagens tumorais humanas, destacando-se seu efeito sobre a linhagem U343, que se trata de um glioblastoma humano. Já estudo realizado por Frozza e colaboradores (2013), mostrou significativa ação citotóxica seletiva do própolis vermelho brasileiro sobre células HeLa e Hep-2.

Além de o extrato de Borá ter apresentado indícios de citotoxicidade seletiva sobre células MDA-MB-231, cabe destacar também que tal extrato apresentou eficácia superior quando comparado ao efeito observado por diversos própolis sobre linhagens de carcinoma de mama. Foi verificado que o tratamento destas células com Borá apresentou um valor de CI_{50} de 22,51 $\mu\text{g/mL}$, um valor considerado baixo, quando comparado a valores de CI_{50} obtidos com extratos etanólicos de outros própolis de abelhas sem ferrão, como os analisados por Surek e colaboradores (2021), que apresentaram valores de CI_{50} em células MDA-MB-231 de 112,17 $\mu\text{g/mL}$, 68,18 $\mu\text{g/mL}$ e de 70,06 $\mu\text{g/mL}$ para própolis oriundos de abelhas Mandaçaia, Tubuna e Mirim, respectivamente. Quando comparado com própolis de abelhas da espécie *Apis mellifera* (abelha com ferrão), como o própolis da Turquia, foi verificado que Borá apresentou CI_{50} inferior ao induzido pelo própolis turco ($CI_{50}= 90,76 \mu\text{g/mL}$) em células MCF-7 (ARU *et al*, 2019). Por fim, quando comparado ao própolis verde, o qual é particularmente conhecido pelo seu potencial citotóxico (FRIÓN-HERRERA *et al.*, 2016), o própolis Borá também apresentou um valor de CI_{50} mais baixo do que o encontrado por Quintino e colaboradores (2020), os quais determinaram o valor de CI_{50} de 56,17 $\mu\text{g/mL}$ em células MCF-7. É provável que as diferenças de eficácia estejam relacionadas à composição química dos própolis, que dependem da flora que circunda a colmeia e das espécies de abelhas presentes na região (LIMA *et al.*, 2016).

No tratamento com 5-FU, observou-se que células McCoy apresentaram sensibilidade comparável àquela mostrada pelas células MDA-MB-231 e HRT-18, acarretando a obtenção de valores de IS próximos a 1. Entretanto, quando comparou-se a citotoxicidade induzida pelo 5-FU em células McCoy à promovida por este antimetabólito nas linhagens HeLa e HepG2, não houve seletividade (Tabela 5).

Por fim, pode-se observar que a linhagem L929 foi menos susceptível a ação de 5-FU, apresentando o maior valor de CI_{50} quando comparada as demais células avaliadas nesse trabalho. A menor susceptibilidade de células L929 ao fármaco acarretou a obtenção de efeito seletivo, quando compara-se a citotoxicidade induzida pelo 5-FU neste fibroblasto à induzida nas linhagens tumorais (Tabela 5).

Considerando-se a citotoxicidade induzida pelo extrato de Borá nas linhagens tumorais e não tumorais avaliadas neste trabalho, bem como os valores de índice de seletividade obtidos, selecionou-se as linhagens MDA-MB-231 e L929 para dar continuidade a este trabalho.

5.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ A QUIMIOTERÁPICOS

Atualmente, em contexto mundial, o câncer de mama trata-se do tipo de neoplasia mais incidente entre mulheres, além de ser a neoplasia responsável pelo maior índice de mortes por câncer nessa população (INCA, 2021). Tal mortalidade pode ser associada ao desenvolvimento de metástases, recorrência tumoral e quimiorresistência, que ocorrem principalmente em tumores classificados como triplo negativos (WU *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2021).

Dessa forma, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o câncer de mama, dentre elas, o uso de terapias combinadas, se faz necessário (CAO *et al.*, 2021). Nesse contexto, abordagens que empregam produtos naturais merecem destaque, visto que estes tratam-se de significativas fontes de quimioterápicos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Pode-se citar o exemplo do paclitaxel, o qual é utilizado clinicamente para o tratamento do câncer de mama localizado em terapia adjuvante

ou neoadjuvante, bem como do câncer de mama metastático (SBOC, 2022a; SBOC, 2022b; SBOC, 2022c).

Logo, apesar do extrato de própolis Borá ter apresentado um valor de CI_{50} bastante significativo para células MDA-MB-231, este trabalho não teve por objetivo caracterizar o potencial citotóxico e/ou antiproliferativo deste própolis isoladamente, e sim de sua associação aos quimioterápicos doxorrubicina (DOXO), paclitaxel (PACLI) e 5-fluorouracil (5-FU), os quais são utilizados na clínica para o tratamento de câncer de mama. Todos esses fármacos, são usados para o tratamento do câncer de mama localizado, sendo DOXO utilizada apenas como terapia adjuvante, enquanto PACLI e 5-FU são usados tanto como adjuvantes ou neoadjuvantes (SBOC, 2022a; SBOC2022b). Ainda, os três fármacos são utilizados para tratamento de doença metastática, no caso de tumores triplo negativos e RH+/HER2 negativo (SBOC, 2022c).

Em relação ao mecanismo de ação antitumoral desses fármacos citados anteriormente, sabe-se que a DOXO pode atuar de três formas: a) ao intercala-se no DNA, inibindo o reparo dessa macromolécula mediado pela topoisomerase II; b) ao inibir a topoisomerase II, interrompendo a replicação do DNA e c) ao promover a produção de radicais livres altamente reativos e tóxicos (TAYMAZ-NIKEREL *et al.*, 2018). Já o paclitaxel atua como um estabilizador de microtúbulos, acarretando a inibição da proliferação de células tumorais por meio da prevenção da mitose, uma vez que tal fármaco promove o bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G2/M (ZHU; CHEN, 2019; KHING *et al.*, 2021). Por fim, o mecanismo de ação do 5-FU envolve a inibição da síntese de timidilato, e conseqüentemente, de DNA. Para isso, o 5-FU é convertido em um antimetabólito, o 5-FdUMP, o qual liga-se ao sítio de ligação de nucleotídeos da timidilato sintetase, formando um complexo ternário estável e bloqueando a interação da enzima com dUMP, bem como a síntese de dTMP e de dTTP. Isso resulta em um desequilíbrio no *pool* de desoxinucleotídeos (dNTP) e elevação dos níveis de trifosfato de desoxiuridina (dUTP), acarretando em danos ao DNA (LONGLLEY *et al.*, 2003).

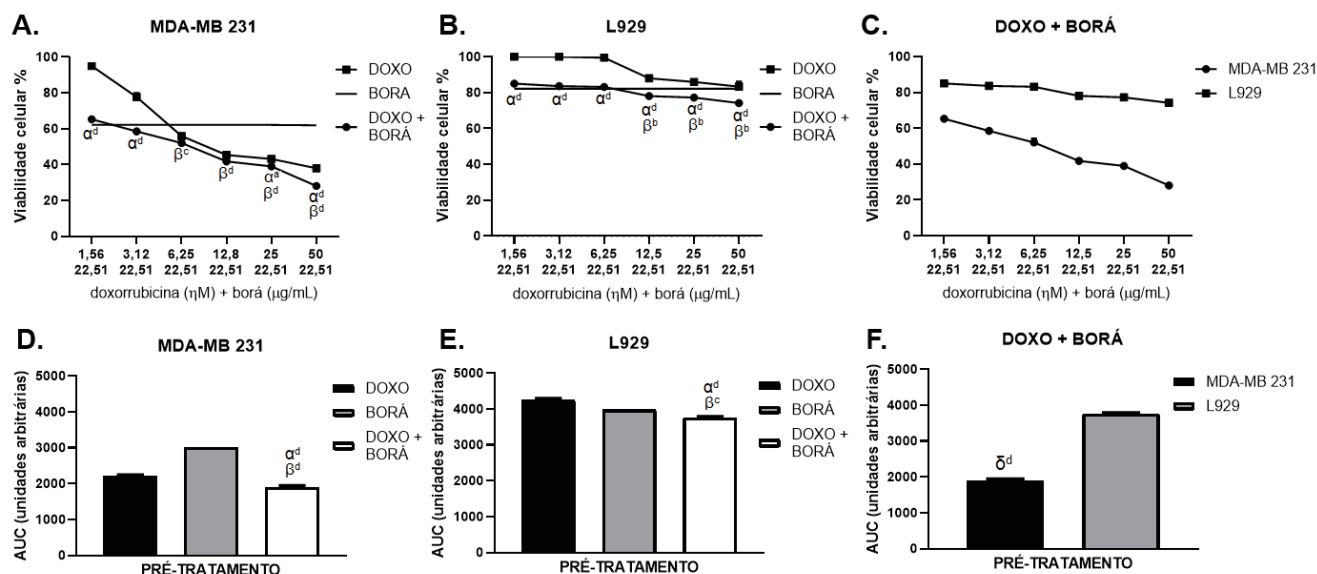
Para melhor avaliação do efeito do própolis Borá sobre a ação destes quimioterápicos, em um primeiro momento, células MDA-MB-231 foram tratadas conforme os esquemas de tratamento previamente descritos no item 4.3 e que

incluem: 1- pré-tratamento com própolis Borá associado a posterior exposição aos quimioterápicos; 2- tratamento concomitante com própolis Borá e quimioterápicos; 3- tratamento prévio com quimioterápicos seguido da exposição ao própolis Borá (pós-tratamento).

Inicialmente pensou-se em testar as associações, empregando-se concentrações equivalentes à concentração plasmática alcançada pelos fármacos no organismo do paciente. Entretanto, ao se fazer os cálculos das concentrações plasmáticas utilizando-se a média de superfície corporal de uma mulher adulta (1,6 m²), e o volume de distribuição de um adulto jovem (2,5 L), obteve-se valores de concentração muito elevados para DOXO e 5-FU, que se aplicados nos ensaios *in vitro*, acarretariam a morte de todas as células semeadas, inviabilizando a execução dos ensaios.

Dessa forma, optou-se por testar diversas concentrações de fármacos, por meio da realização de uma curva concentração-resposta, aumentando a probabilidade de se identificar concentrações em que poderia ocorrer a potencialização de efeito pela(s) associação(ões). Os resultados obtidos estão representados nas Figuras de 7 a 15.

FIGURA 7 - Efeitos do tratamento com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.



FONTE: A autora (2022).

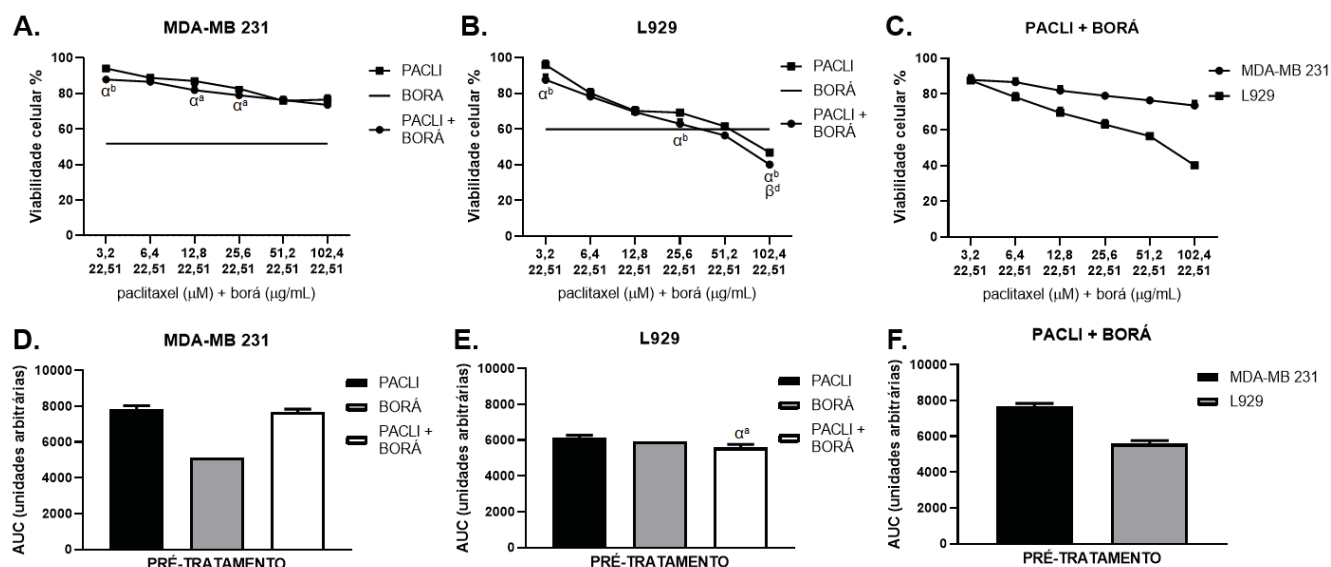
LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com DOXO (1,56 – 50 η M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^a e α^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação à DOXO. B^b , β^c e β^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao BORÁ. δ^d representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,0001$ em relação a seletividade celular das associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231.

Os resultados ilustrados na Figura 7 mostram que o pré-tratamento de células MDA-MB-231 com extrato de Borá seguido da exposição à DOXO, aumentou significativamente a citotoxicidade induzida pelo fármaco, quando DOXO foi aplicada nas concentrações de 1,56, 3,12, 25 e 50 η M (Figura 7A). Ainda, a associação DOXO + BORÁ potencializou a citotoxicidade induzida pelo própolis, quando DOXO foi aplicada a partir da concentração de 6,25 η M. Tais efeitos culminaram em uma diminuição significativa da área sob a curva, tanto em relação ao tratamento com DOXO, quanto ao tratamento com BORÁ, mostrando que a associação é capaz de potencializar o efeito citotóxico deste fármaco e do própolis nas células de câncer de mama triplo negativas (Figura 7D).

Já em células L929, a análise da área sob a curva, mostra que a associação DOXO + BORÁ, potencializa a ação citotóxica em relação ao tratamento das células com BORÁ e DOXO (Figura 7B). Tal efeito, é decorrente da potencialização significativa observada quando DOXO foi aplicada nas concentrações de 12,5, 25 e de 50 η M, onde verifica-se a ocorrência de diferença estatística tanto em relação ao tratamento com DOXO, quanto ao tratamento com BORÁ (Figura 7B). Nas demais concentrações de DOXO aplicadas, pode-se observar que a citotoxicidade promovida pela associação pode ser atribuída a ação do própolis (Figura 7B).

Por fim, pode-se observar que a associação DOXO + BORÁ apresentou efeito seletivo em células MDA-MB-231, uma vez que observou-se redução significativa da viabilidade celular da linhagem tumoral, em comparação à viabilidade da linhagem não tumoral (Figura 7F).

FIGURA 8 - Efeitos do tratamento com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.



FONTE: A autora (2022).

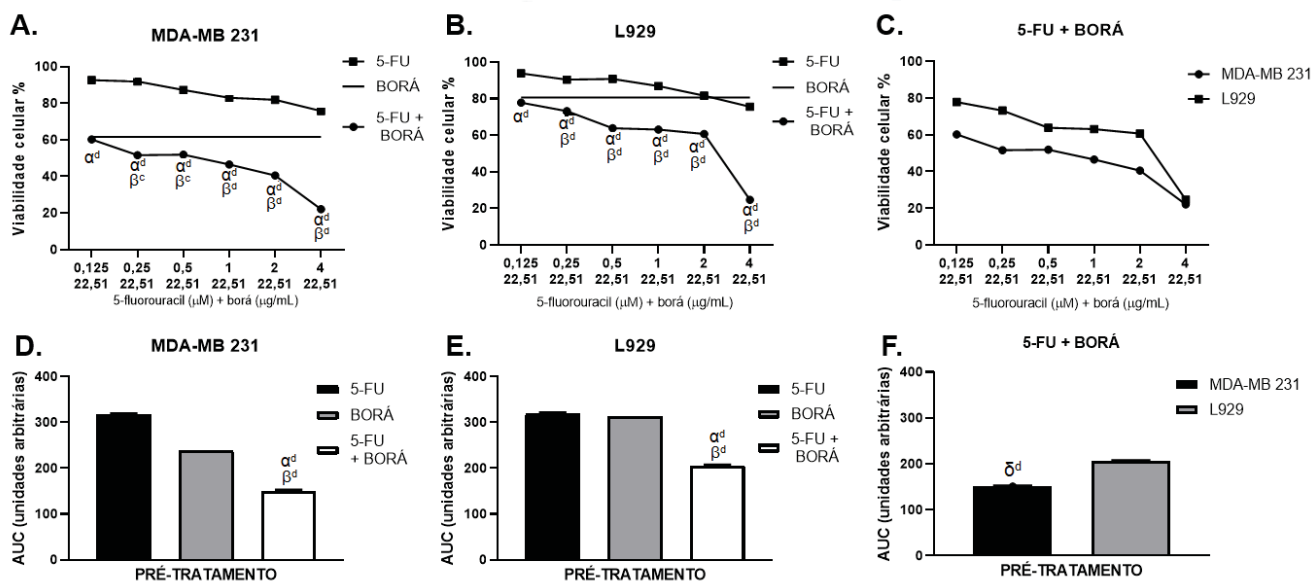
LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com PACLI (3,2 – 102,4 μ M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^a e α^b representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente em relação ao PACLI. β^d representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,0001$ relação ao BORÁ.

Pode-se observar que a associação BORÁ + PACLI, diminuiu de forma significativa a viabilidade de células MDA-MB-231 em relação ao PACLI, apenas quando este foi aplicado nas concentrações de 3,2, 12,8 e de 25,6 μM (Figura 8A). Além disso, nenhuma redução significativa na viabilidade celular foi verificada quando compara-se o efeito da associação, ao tratamento com BORÁ. Desta forma, não foi evidenciada diminuição da AUC quando compara-se o efeito promovido pela associação ao induzido por PACLI e BORÁ, demonstrando que o pré-tratamento com BORÁ, seguido da exposição ao PACLI não foi capaz de potencializar o efeito do própolis e do fármaco aplicados isoladamente neste tipo celular (Figura 5D).

O tratamento de células L929 com a associação PACLI + BORÁ foi capaz de elevar significativamente a citotoxicidade de PACLI, quando o fármaco foi aplicado nas concentrações de 3,2, 25,6 e de 102,4 μM (Figura 8B). O único tratamento capaz de potencializar a citotoxicidade induzida por PACLI e BORÁ concomitantemente, refere-se aquele em que tais tratamentos foram aplicados nas concentrações de 102,4 μM e de 22,51 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dessa forma, observou-se apenas redução significativa da área sob a curva, comparando-se a associação PACLI + BORÁ ao fármaco aplicado isoladamente (Figura 8E).

Por fim, salienta-se que a associação PACLI + BORÁ foi mais citotóxica para os fibroblastos L929, não apresentando citotoxicidade seletiva sobre as células de carcinoma mamário (Figura 5F).

FIGURA 9 - Efeitos do tratamento com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.

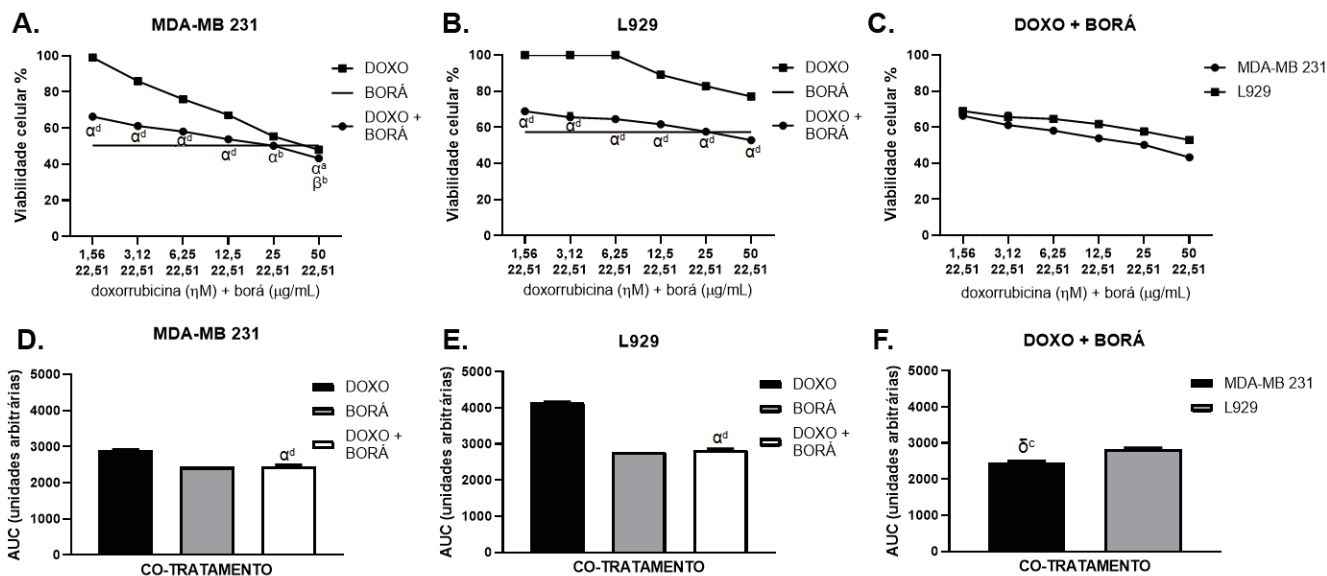


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com 5-FU (0,125 – 4 μ M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^d representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,0001$, em relação ao 5-FU. β^p e β^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao BORÁ (22,51 μ g/mL). δ^d representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,0001$ em relação a seletividade celular das associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231.

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que, de maneira geral, o pré-tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com própolis BORÁ seguido da exposição ao 5-FU reduziu significativamente a viabilidade celular na maioria das concentrações do fármaco testadas, tanto em relação ao antimetabólito, quanto em relação a BORÁ (Figuras 9A e 9B). Esses dados mostram que tal associação é capaz de potencializar a ação citotóxica destes agentes aplicados de forma isolada. Ainda, pode-se observar que a associação 5-FU + BORÁ apresentou citotoxicidade seletiva na linhagem tumoral, uma vez que promoveu redução significativa da área sob a curva, quando se compara o efeito induzido pela associação em células MDA-MB-231 ao promovido pela mesma em células L929 (Figura 9F).

FIGURA 10 - Efeitos do tratamento com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de co-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929

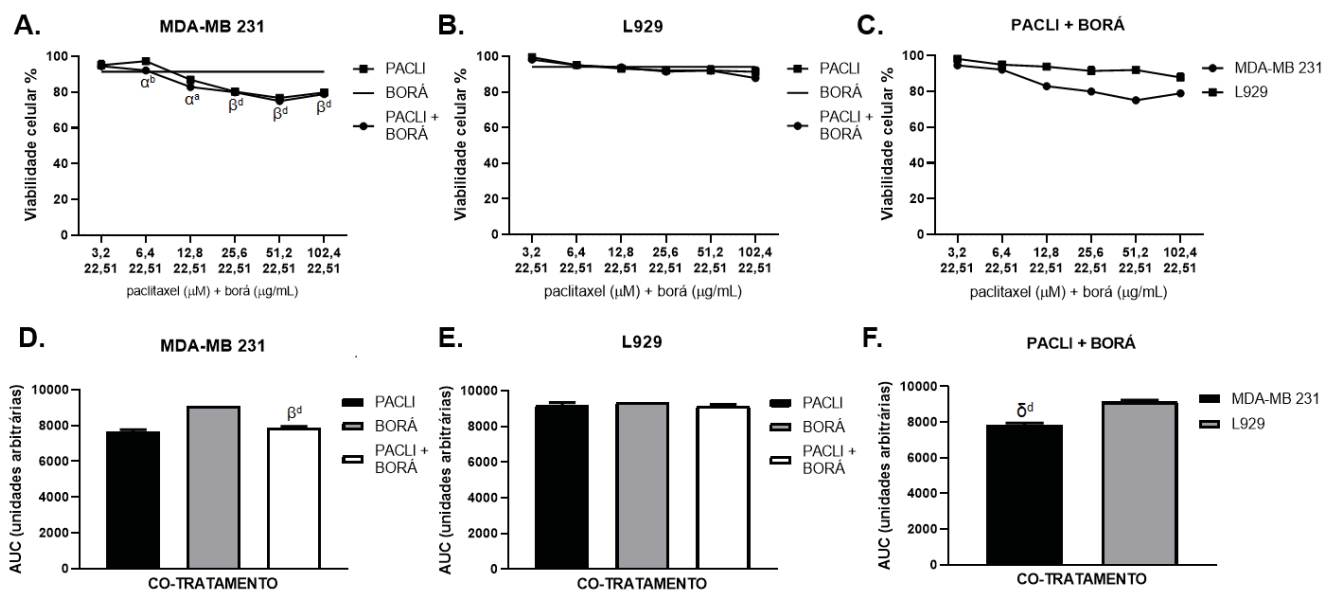


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com DOXO (1,56 – 50 η M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^a , α^b e α^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação à DOXO. β^b representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, em relação ao BORÁ. δ^c representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,001$ em relação a seletividade celular das associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com a MDA-MB-231.

A Figura 10 mostra os resultados obtidos após o tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com a associação DOXO + BORÁ aplicados na forma de co-tratamento. Pode-se observar que, de maneira geral, tanto para células MDA-MB-231, quanto para fibroblastos L929, a associação foi capaz de elevar estatisticamente apenas a citotoxicidade induzida por DOXO, sugerindo que o efeito citotóxico prevalente apresentado pela associação se deve a ação de BORÁ (Figuras 10A e 10B). Ainda, a associação apresentou menor viabilidade em células MDA-MB-231, do que em L929, mostrando que tal co-tratamento apresenta efeito seletivo sobre a linhagem tumoral (Figura 10F).

FIGURA 11 - Efeitos do tratamento com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μM) + BORÁ (22,51 $\mu\text{g/mL}$), seguindo esquema de co-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.

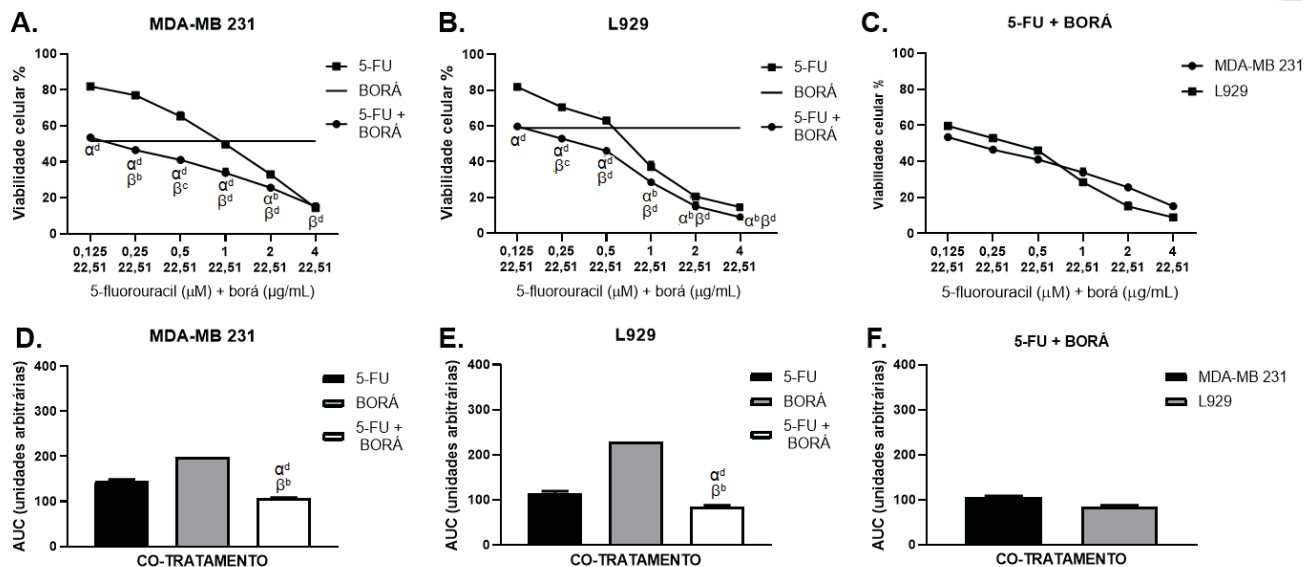


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com PACLI (3,2 – 102,4 μM), BORÁ (22,51 $\mu\text{g/mL}$) e associações PACLI (3,2 – 102,4 μM) + BORÁ (22,51 $\mu\text{g/mL}$). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações PACLI (3,2 – 102,4 μM) + BORÁ (22,51 $\mu\text{g/mL}$) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μM) + BORÁ (22,51 $\mu\text{g/mL}$). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações PACLI (3,2 – 102,4 μM) + BORÁ (22,51 $\mu\text{g/mL}$) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^a e α^b representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao PACLI. β^d representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,0001$, em relação ao BORÁ. δ^d representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,0001$ em relação a seletividade celular das associações PACLI (3,2 – 102,4 μM) + BORÁ (22,51 $\mu\text{g/mL}$) em L929 comparando-a com a MDA-MB-231.

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que, de maneira geral, em células MDA-MB-231, a associação BORÁ + PACLI aplicada na forma de co-tratamento, foi capaz de aumentar apenas a ação citotóxica de BORÁ, sugerindo que a redução da viabilidade celular promovida por tal associação deve-se principalmente ao efeito isolado induzido por PACLI (Figura 11A). Ainda, pode-se observar que PACLI, BORÁ e a associação BORÁ + PACLI não causaram citotoxicidade significativa em células L929 (Figura 11B), o que acarretou a indução de efeito citotóxico seletivo da associação na linhagem tumoral (Figura 11F).

FIGURA 12 - Efeitos do tratamento com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de co-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.

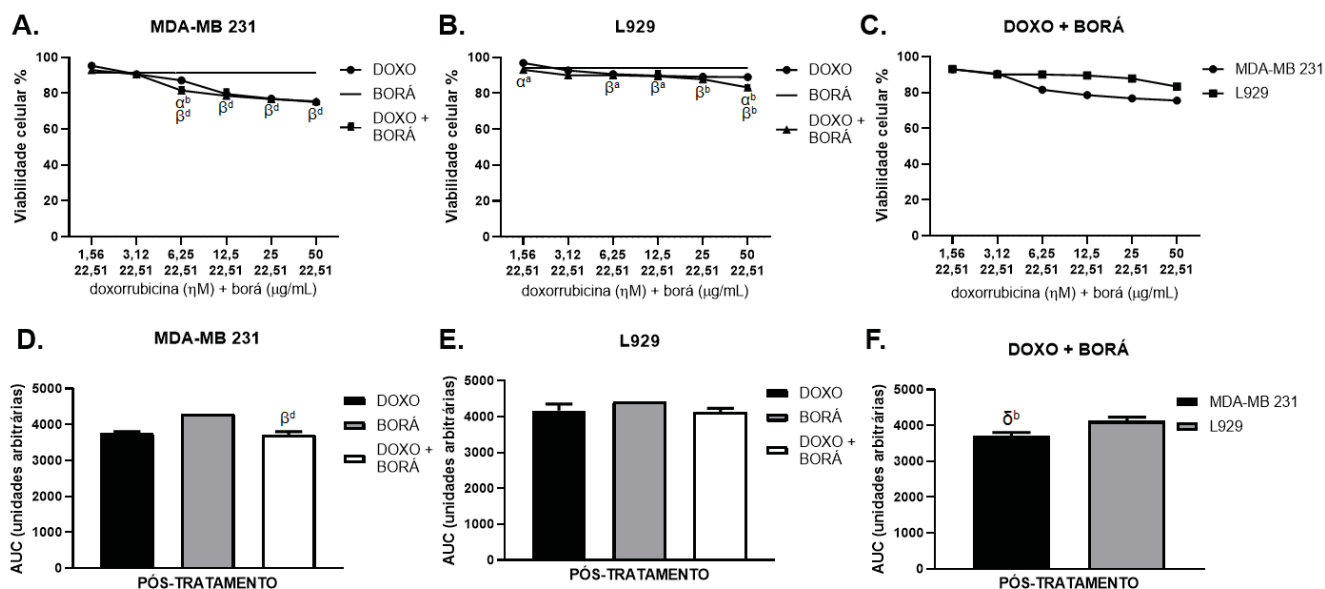


FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com 5-FU (0,125 – 4 μ M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^b e α^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^b , β^c e β^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao BORÁ.

O co-tratamento mais efetivo foi aquele realizado com BORÁ + 5-FU. Foi verificado que o tratamento de células MDA-MB-231 e L929 com tal associação, de maneira geral, potencializou o efeito de BORÁ e de 5-FU na maioria das concentrações de 5-FU aplicadas (Figuras 12A e 12B), acarretando significativa redução da área sob a curva (Figuras 12D e 12E). Entretanto, tal associação não apresentou ação citotóxica seletiva sobre as células tumorais avaliadas (Figura 12F).

FIGURA 13 - Efeitos do tratamento com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pós-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.



FONTE: A autora (2022).

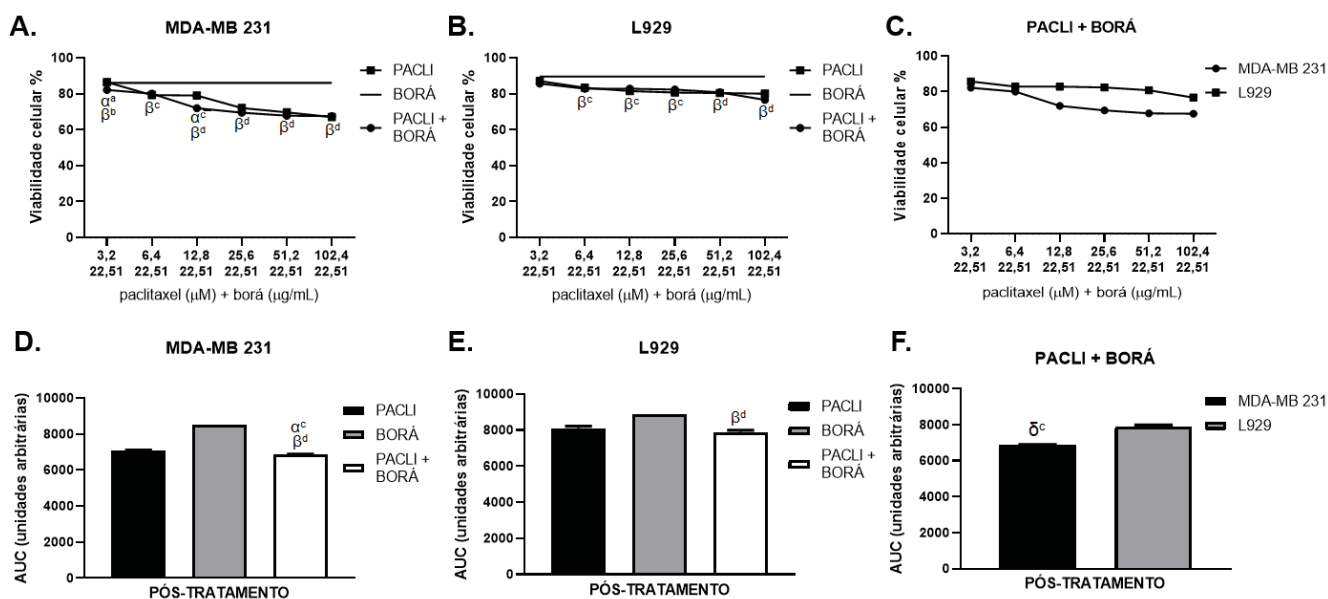
LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com DOXO (1,56 – 50 η M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^a e α^b representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação à DOXO. β^a , β^c e β^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao BORÁ. δ^b representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$ em relação a seletividade celular das associações DOXO (1,56 – 50 η M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com a MDA-MB-231.

O pós-tratamento de células MDA-MB-231 com a associação DOXO + BORÁ, com exceção do tratamento em que DOXO foi aplicada na concentração de 6,25 η M, reduziu de forma significativa a viabilidade celular apenas em relação ao tratamento com o própolis (Figura 13A). Esses dados mostram que a associação não é capaz de potencializar o efeito induzido pelo fármaco aplicado de forma isolada.

Em relação à linhagem L929, pode-se verificar que a associação potencializou a ação citotóxica de BORÁ e da DOXO, apenas quando esta foi aplicada nas concentrações de 1,56 e de 50 η M (Figura 13B). Dessa forma, não houve diferença estatística na AUC comparando-se os efeitos promovidos pela associação, BORÁ e

DOXO, e demonstrando que a associação não foi capaz de sensibilizar células L929 a ação destes agentes (Figura 13E). Por fim, observa-se que a associação DOXO + BORÁ aplicada na forma de pós tratamento, apresentou ação citotóxica seletiva sobre células MDA-MB-231 (Figura 13F).

FIGURA 14 - Efeitos do tratamento com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pós-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com PACLI (3,2 – 102,4 μ M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^a e α^c representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao PACLI. β^b , β^c e β^d representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao BORÁ. δ^c representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,001$ em relação a seletividade celular das associações PACLI (3,2 – 102,4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com a MDA-MB-231.

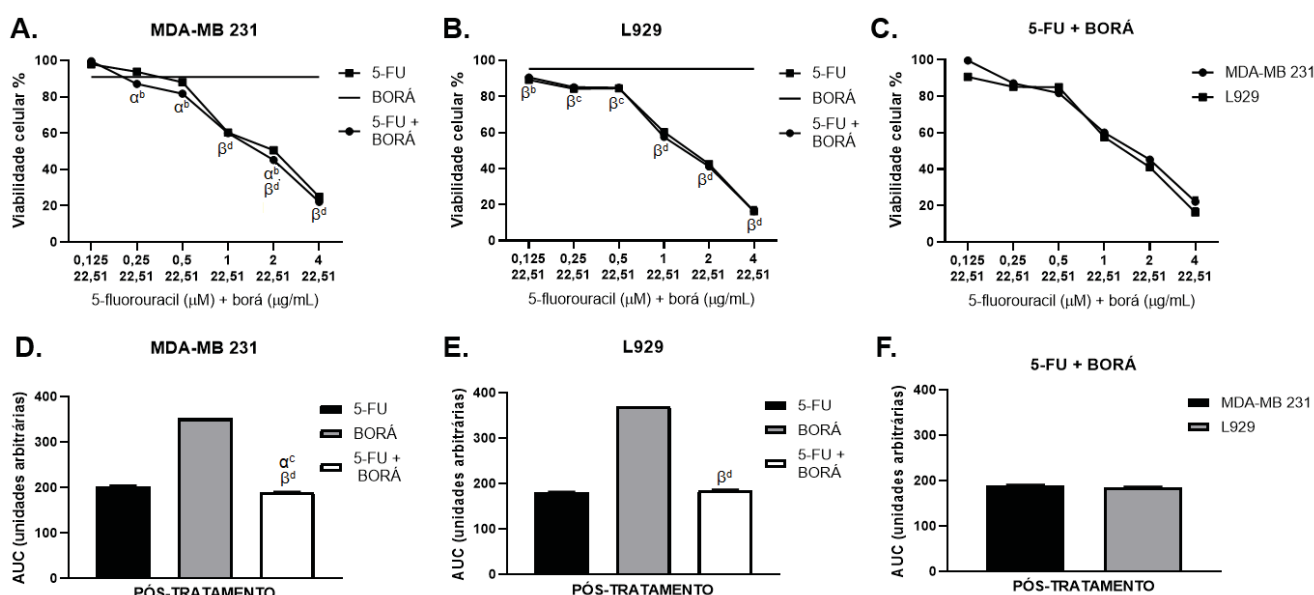
O pós-tratamento de células MDA-MB-231 com a associação PACLI + BORÁ, potencializou o efeito de PACLI e BORÁ, acarretando redução significativa da área sob a curva (Figura 14D). Entretanto, não se considerou a redução da viabilidade celular demonstrada pelo cálculo da área sob a curva efetiva, visto que a mesma se trata de um efeito pontual, observado quando PACLI foi testado nas concentrações de 3,2 e de 12,8 μ M. Na maioria dos pontos da curva, não observou-se diferença estatística entre a associação PACLI + BORÁ e PACLI, sugerindo que tal redução

citada deve-se a erros experimentais, e que a associação apresentou maior citotoxicidade apenas quando comparada a BORÁ (Figura 14A).

Em relação à linhagem L929, pode-se verificar que a associação PACLI + BORÁ, reduziu de forma significativa a viabilidade celular apenas em relação ao tratamento com o própolis, não sendo capaz de potencializar o efeito de PACLI aplicado isoladamente (Figura 14B).

Por fim, observa-se que a associação PACLI+ BORÁ aplicada na forma de pós-tratamento apresentou ação citotóxica seletiva sobre células MDA-MB-231 (Figura 14F).

FIGURA 15 - Efeitos do tratamento com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pós-tratamento, na viabilidade de células MDA-MB-231 e L929.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Curvas de viabilidade celular, após o tratamento de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) com 5-FU (0,125 – 4 μ M), BORÁ (22,51 μ g/mL) e associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação da viabilidade celular induzida pelas associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (C). Área sob a curva para demonstrar os efeitos globais na viabilidade celular após o tratamento de células MDA-MB-231 (D) e L929 (E) com as associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação dos efeitos globais na viabilidade celular induzida pelas associações 5-FU (0,125 – 4 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929 (F). α^b representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, em relação ao 5-FU. β^b , β^c e β^d representam diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao BORÁ.

O pós-tratamento de células MDA-MB-231 com a associação 5-FU + BORÁ, potencializou o efeito de 5-FU e BORÁ, acarretando redução significativa da área sob

a curva (Figura 15D). Entretanto, sugere-se que tal redução na AUC, em relação ao tratamento com 5-FU seja decorrente de erros experimentais, uma vez que, ao analisar-se a curva de citotoxicidade da associação e do 5-FU aplicado isoladamente, observa-se praticamente uma sobreposição, com exceção dos pontos em que 5-FU foi aplicado nas concentrações de 0,25, 0,5 e 2 μM (Figura 15A).

Em relação à linhagem L929, pode-se verificar que a associação 5-FU + BORÁ pós-tratamento, reduziu de forma significativa a viabilidade celular apenas em relação ao tratamento com BORÁ, não sendo capaz de potencializar o efeito do antimetabólito aplicado isoladamente (Figura 15B).

Por fim, observa-se que a associação 5-FU + BORÁ aplicada na forma de pós-tratamento não apresentou ação citotóxica seletiva sobre células MDA-MB-231 (Figura 15F).

Em suma, os resultados obtidos mostraram que o esquema de tratamento mais efetivo foi o pré-tratamento 5-FU + BORÁ (Figura 9), o qual, apesar de ter potencializado o efeito de 5-FU e de BORÁ nas linhagens MDA-MB-231 e L929, apresentou efeito citotóxico seletivo sobre as células tumorais. Desta forma, este esquema foi selecionado para dar continuidade a este estudo.

Alguns estudos têm mostrado o efeito benéfico da associação de própolis e seus constituintes a quimioterápicos no combate a tumores ou indução de citotoxicidade em células tumorais. Tem sido demonstrado que tanto própolis de *A. mellifera* como de espécies de abelha sem ferrão, são capazes de potencializar o efeito citotóxico de quimioterápicos como doxorrubicina sobre várias linhagens tumorais (BARTOLOMEU *et al.*, 2016; ROUIBAH *et al.*, 2018, SUREK *et al.*, 2021). Além disso, foi verificado o efeito benéfico dessa associação em modelos experimentais animais. Por exemplo, foi relatado que o própolis Iraniano, quando administrado concomitantemente ao 5-FU em camundongos, é capaz de reduzir o número de focos de criptas aberrantes induzida por aximetano, além de diminuir a expressão de β -catenina, iNOS e COX-2, em comparação ao tratamento com 5-FU e própolis administrados isoladamente (SAMENI *et al.*, 2021).

É importante destacar que a maioria destes estudos foram realizados associando própolis a quimioterápicos por meio de uma abordagem de co-tratamento. Como exemplo, pode-se citar o estudo realizado por Cardoso e colaboradores (2021) que avaliou o efeito citotóxico do extrato etanólico de própolis verde associado ao quimioterápico docetaxel em células MCF-7. Os mesmos autores observaram maior citotoxicidade quando aplicaram o própolis concomitantemente ao quimioterápico, do que quando trataram as células com o quimioterápico isoladamente. Já Bartolomeu e colaboradores (2016) avaliaram o efeito do geoprópolis brasileiro associado a doxorrubicina em células HEp-2. Os autores observaram que essa combinação diminuiu a viabilidade celular para 43,5% após 72 h de tratamento.

Até o presente momento, não foi observado nenhum estudo em que a associação de própolis a quimioterápicos tenha sido realizada por meio de pré-tratamento e pós-tratamento com esta resina, evidenciando a importância do presente estudo e mostrando que estes esquemas de tratamento devem ser melhor explorados, visto que, levando em consideração os dados aqui mostrados, se apenas a abordagem de co-tratamento tivesse sido realizada, significativos efeitos induzidos pelo pré-tratamento não teriam sido detectados.

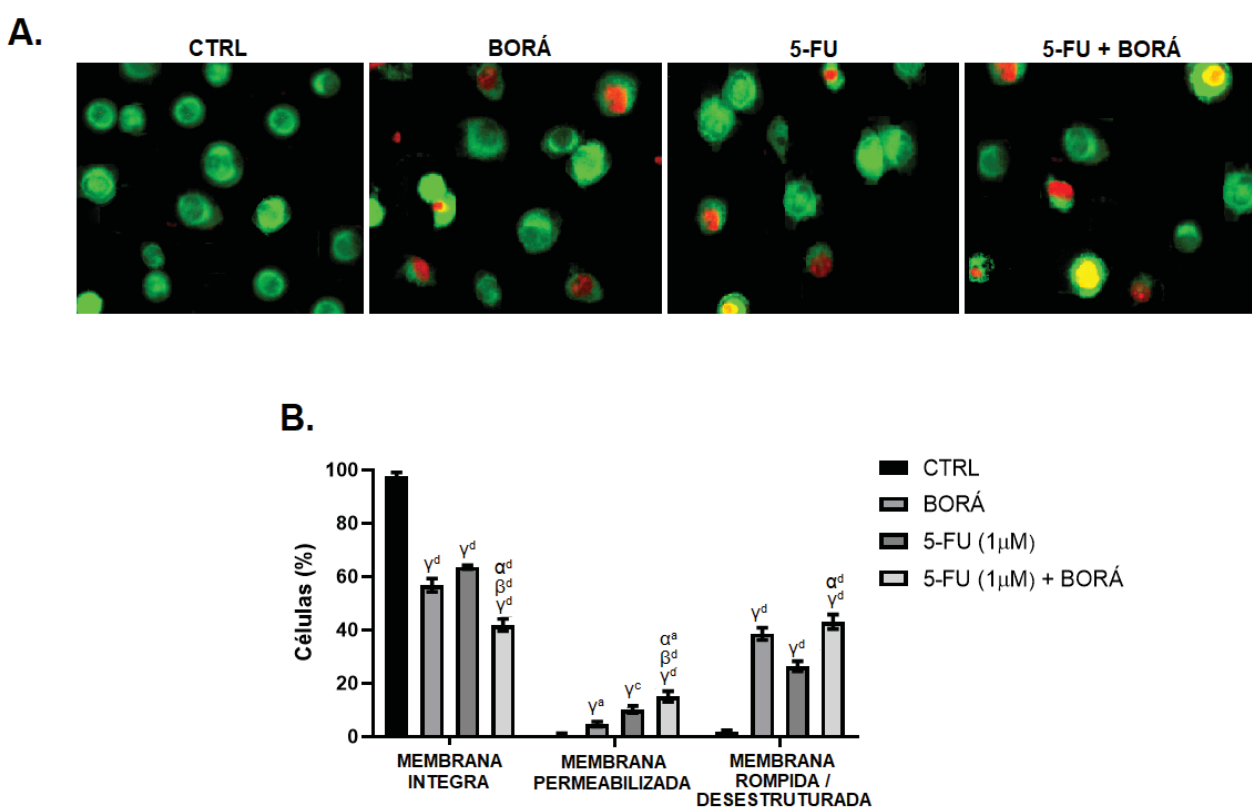
Por fim, os benefícios da associação de própolis a quimioterápicos também tem sido explorado visando a minimização de efeitos adversos causados por estes. Nesse sentido, foi observado que o extrato aquoso de própolis, administrado concomitantemente a 5-FU e mitomicina C em animais portadores do carcinoma ascítico de Ehrlich, foi capaz de reduzir o volume tumoral em comparação ao tratamento com os quimioterápicos isolados; além de ter reduzido a citopenia causada pela administração de tais fármacos, uma vez que foi observada recuperação parcial do número de leucócitos e eritrócitos entre grupos tratados com as associações e o grupo controle negativo (SUZUKI *et al.*, 2002). Ainda, foi demonstrado em modelos experimentais animais, que o CAPE é capaz de reverter danos renais, cardíacos e cerebrais causados pela doxorrubicina, além de minimizar danos hepáticos, renais e fibrose pulmonar causados por quimioterápicos como cisplatina, metotrexato, tamoxifeno e bleomicina (LIU *et al.*, 2012). Já um *trial* clínico demonstrou que um própolis padronizado e contendo de 8-12% de galangina, quando administrado

concomitantemente ao bicarbonato de sódio, foi capaz de prevenir de forma efetiva a mucosite oral causada pela doxorubicina e ciclofosfamida (PIREDDA *et al.*, 2017).

5.3. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO TIPO DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ AO 5-FLUOROURACIL

Uma vez que se observou que a associação 5-FU + BORÁ, independente da concentração de 5-FU aplicada, induziu um efeito citotóxico significativo em células MDA-MB-231, em regime de pré-tratamento, achou-se pertinente verificar, de forma preliminar, o tipo de morte celular induzido por essa combinação sob tal regime. Para a execução deste experimento, utilizou-se uma única concentração de 5-FU (1 μ M). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16.

FIGURA 16 - Avaliação preliminar do tipo de morte induzida por Borá, 5-FU e sua associação, baseado na indução de alterações na permeabilidade e integridade de membrana.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Imagens representativas adquiridas em microscópio de fluorescência, na objetiva de aumento de 20 x, de células MDA-MB-231 coradas com iodeto de propídeo e laranja de acridina, evidenciando células com membrana íntegra (verdes), considerada viáveis, células com membrana

permeabilizada (amarelas) e células com membrana rompida (vermelhas) no grupo controle (CTRL), BORÁ (22,51 µg/mL), 5-FU (1 µM) e 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL), aplicados seguindo esquema de pré-tratamento (A). Análise quantitativa do número de células com membrana íntegra, permeabilizada e rompida resultantes do tratamento com BORÁ (22,51 µg/mL), 5-FU (1 µM) e 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) (B). α^a e α^d representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao 5-FU (1 µM). β^d representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,0001$, em relação ao BORÁ (22,51 µg/mL). γ^a , γ^c e γ^d representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

Os resultados da Figura 16, demonstram que os tratamentos com BORÁ, 5-FU (1 µM) e associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) foram capazes de reduzir significativamente o percentual de células com membrana íntegra, e, portanto, a viabilidade celular, quando comparados ao CTRL (Figura 16B). Além disso, BORÁ, 5-FU (1 µM) e associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL), foram capazes de elevar em torno de 8,4, 18,4 e 27 vezes, respectivamente, o percentual de células com poros na membrana, em relação ao CTRL. Por fim, BORÁ, 5-FU (1 µM) e associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL), elevaram em torno de 23,1, 15,9 e 25,9 vezes, respectivamente, o percentual de células com membrana rompida e/ou desestruturada, em relação ao CTRL. Dessa forma, embora os tratamentos tenham induzido significativas alterações na integridade/estruturação da membrana, sugere-se que o tipo de morte induzido predominantemente trata-se de um daqueles em que se observa o rompimento de membrana, tais como morte acidental (necrose), necroptose ou parthanatos; ou desestruturação da mesma, como apoptose tardia, uma vez que se observou grande incorporação de iodeto de propídeo (Figura 16A).

Ainda, pode-se verificar que a associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) foi capaz de reduzir em torno de 1,4 e de 1,5 vezes o percentual de células viáveis em relação ao tratamento com BORÁ e 5-FU (1 µM), respectivamente. Esses dados confirmam os resultados do MTT da associação apresentados previamente (Figura 9), mostrando a capacidade da combinação em potencializar o efeito citotóxico de BORÁ e do 5-FU aplicados isoladamente.

Além disso, é possível observar que a associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL), em comparação ao tratamento com BORÁ, foi capaz de elevar em 3,2 vezes o percentual de células que apresentam membrana permeabilizada, não tendo sido

verificada diferença estatística em relação à incorporação de iodeto de propídeo induzida pelo extrato de própolis.

Por fim, foi demonstrado que tal associação promoveu um aumento de 1,5 e de 1,6 vezes na permeabilização e ruptura/desestruturação da membrana, respectivamente, promovida pelo 5-FU (1 μ M).

Resumidamente, os resultados obtidos mostram que a associação foi capaz de potencializar a formação de poros na membrana promovida tanto por BORÁ quanto por 5-FU (1 μ M), além de ter elevado significativamente a ruptura/desestruturação da membrana promovida pelo antimetabólito (Figura 16B). Ainda, é pertinente ressaltar que, embora a associação tenha promovido significativa alteração da permeabilidade de membrana de células MDA-MB-231, sugerindo a indução de apoptose inicial, o mecanismo de morte predominantemente induzido pela mesma envolve ruptura ou desorganização da membrana, podendo-se sugerir a ocorrência dos seguintes processos de morte: morte acidental (necrose), necroptose, parthanatos ou apoptose tardia. Enfatiza-se a necessidade de se mensurar marcadores específicos desses processos, para se elucidar de forma precisa o mecanismo de morte celular envolvido.

Os resultados obtidos corroboram a literatura científica, no que se refere a identificação de mecanismos de morte induzidos pelo uso de própolis associado a quimioterápicos em células de carcinoma mamário. Foi verificado que, em células MCF-7, a associação do extrato etanólico de própolis verde ao docetaxel, foi capaz de elevar significativamente a necrose induzida pelo fármaco aplicado isoladamente (CARDOSO *et al.*, 2021). Já Rouibah e colaboradores (2021) verificaram que a associação do extrato etanólico do própolis algeriano à doxorubicina, foi capaz de potencializar a apoptose induzida pelo fármaco sobre células MDA-MB-231.

5.4. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ AO 5-FLUOROURACIL

Os cânceres de mama triplo negativos são, na maioria das vezes, carcinomas ductais invasivos de alto grau, caracterizados por um fenótipo clínico agressivo. Tem

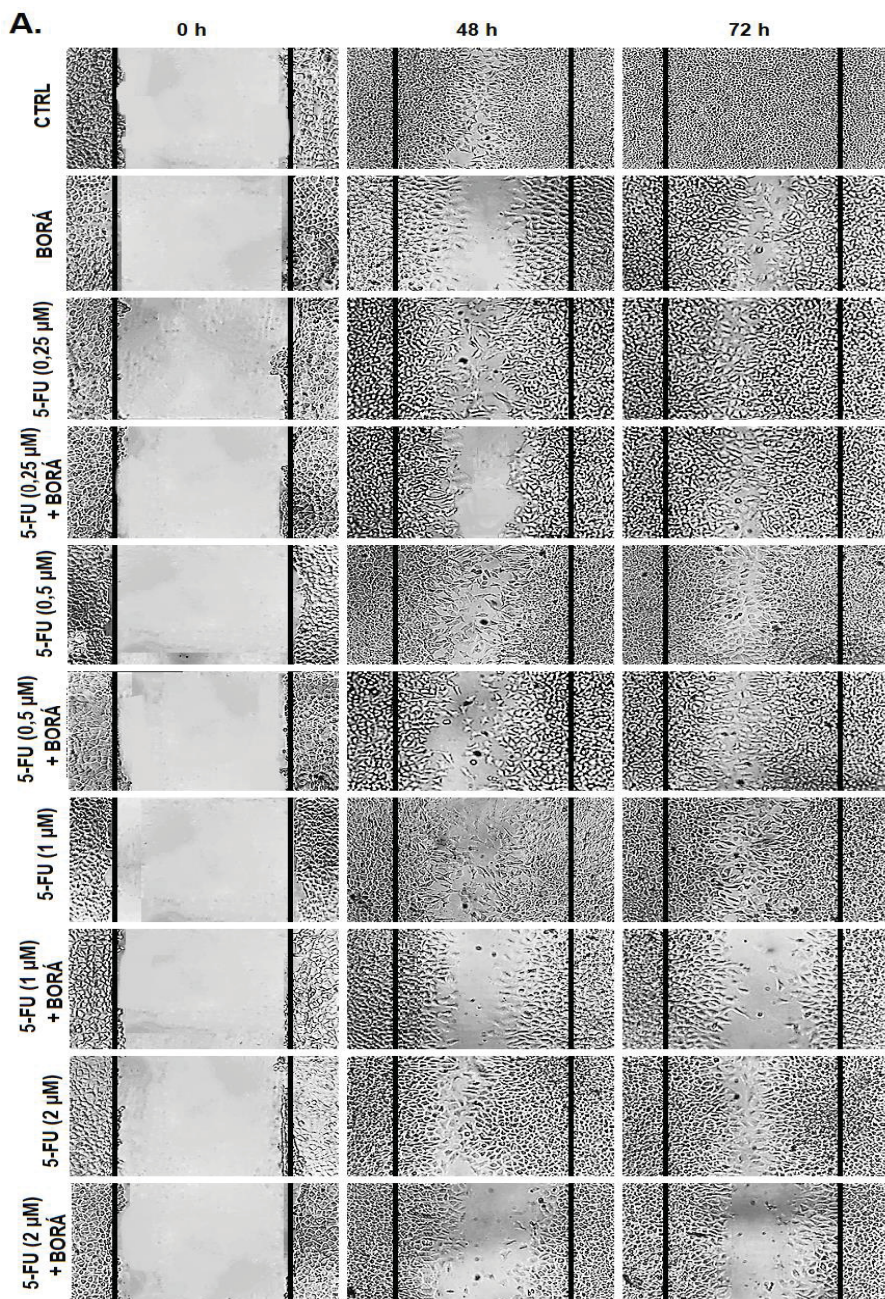
sido estimado que cerca de 25% dos pacientes com câncer de mama triplo negativo terão recidiva da doença com metástase à distância, mesmo em casos de doença localizada. Dentre os órgãos mais acometidos no caso de doença metastática associada a presença de tumor de mama triplo negativo, merecem destaque os pulmões, fígado e cérebro (O'REILLY *et al.*, 2021).

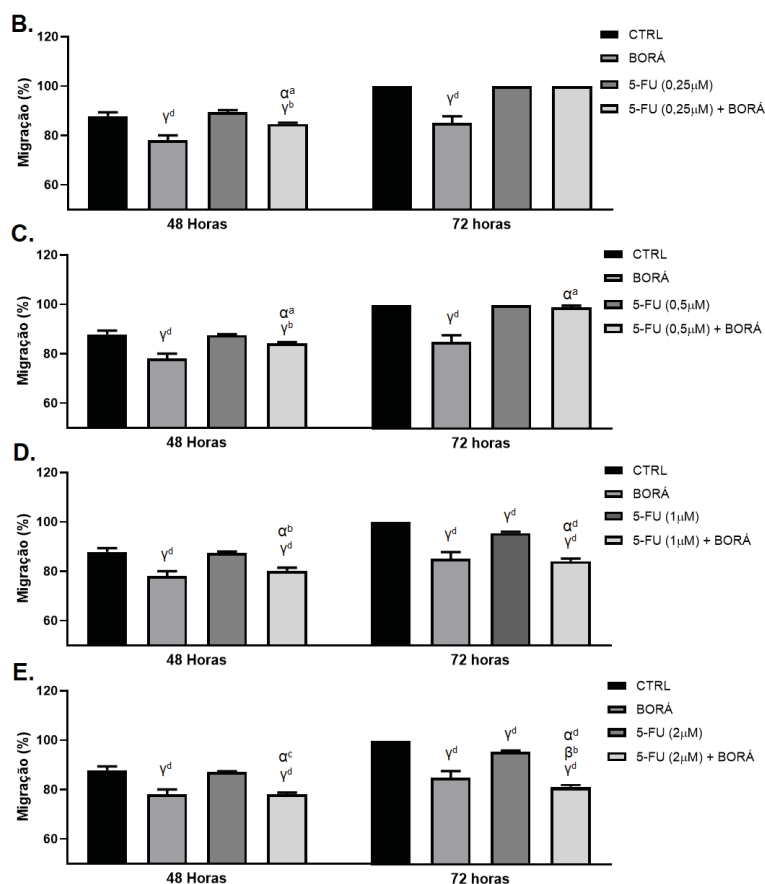
Ainda, deve-se destacar que o desenvolvimento de metástases relacionada a presença de tumores triplo negativos está associada a um pior prognóstico. Para pacientes com doença avançada ou no estágio IV, a média de sobrevida global (OS) é de 12 meses, onde estima-se que em torno de 20% destes pacientes sobreviverão por um período de 4 anos. Já para pacientes com doença metastática e que apresentam câncer de mama do subtipo luminal A, o qual pode ser considerado um fenótipo menos agressivo, a OS estabelecida é de cerca de 36 meses. Além disso, estima-se que 40% destes pacientes sobrevivam por um período de 4 anos (O'REILLY *et al.*, 2021).

Desta forma, mediante os resultados promissores da associação 5-FU + BORÁ em potencializar a atividade citotóxica de BORÁ e de 5-FU aplicados isoladamente, achou-se pertinente avaliar se essa combinação seria capaz de reduzir a migração celular, etapa esta, fundamental para a ocorrência de metástase (FIDLER; KRIPKE, 2015).

Para a execução desses experimentos, usou-se 5-FU nas concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 μM e a concentração de Borá permaneceu fixada em 22,51 $\mu\text{g/mL}$, como previamente estabelecido. Os resultados obtidos foram demonstrados na Figura 17.

FIGURA 17 - Avaliação da inibição da migração celular durante tratamento com Borá, 5-FU e suas associações.





FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Imagens capturadas de células MDA-MB-231 no tempo 0 h, 48 h e 72 h após seu tratamento com as associações 5-FU (0,25 – 2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) e respectivos controles aplicados em esquema de pré-tratamento, para avaliação da inibição da migração (A). Análise quantitativa do percentual de migração dos grupos associados 5-FU (0,25 – 2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) em comparação ao grupo controle (CTRL), BORÁ e 5-FU 0,25 µM (B), 5-FU 0,5 µM (C), 5-FU 1 µM (D), 5-FU 2 µM (E), nos tempos 48 h e 72 h. α^a , α^b , α^c e α^d representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^b representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, em relação ao BORÁ. γ^b e γ^d representam diferença estatisticamente significativas de $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

A Figura 17 mostra que tanto BORÁ, quanto 5-FU nas concentrações de 1 µM e de 2 µM, foram capazes de reduzir significativamente a migração celular após 72 h de tratamento, quando comparados ao CTRL (Figuras 17 D e E).

Em relação as associações, é evidente que a redução na migração celular observada nas primeiras 48 h se deve a ação de BORÁ, o qual foi o único tratamento

aplicado neste intervalo de tempo, de acordo com o esquema terapêutico adotado e mostrado no item 4.3. Sugere-se que tal inibição da migração promovida pelo extrato de própolis, deve-se parcialmente a ação citotóxica do extrato, visto que em 48 h, a concentração de 22,51 µg/mL foi capaz de reduzir a viabilidade celular em torno de 30%. Já após 72 h de tratamento, pode-se verificar que a única associação capaz de reduzir significativamente a migração celular foi aquela em que 5-FU foi aplicado na concentração de 2 µM, onde verificou-se que a mesma reduziu a migração 1,2 vezes em relação ao BORÁ e 4,12 vezes em relação ao 5-FU, respectivamente (Figura 17 E). Dessa forma, sugere-se que 5-FU auxiliou na manutenção da redução da migração induzida por BORÁ.

Diversos estudos têm demonstrado o papel de própolis em reduzir a migração de células tumorais. Pode-se citar por exemplo, o trabalho realizado por Begnini e colaboradores (2014), onde foi demonstrado que o própolis vermelho brasileiro foi capaz de reduzir a migração de células de câncer de bexiga 5637. Já Chang e colaboradores (2017) verificaram que o extrato etanólico de própolis chinês foi capaz de inibir a migração de células MDA-MB-231 induzida por LPS, associando tal inibição ao efeito antiinflamatório deste própolis.

Até o presente momento, não foi verificada a interferência de própolis associados a quimioterápicos na migração de células tumorais, sendo este trabalho inédito nesse sentido.

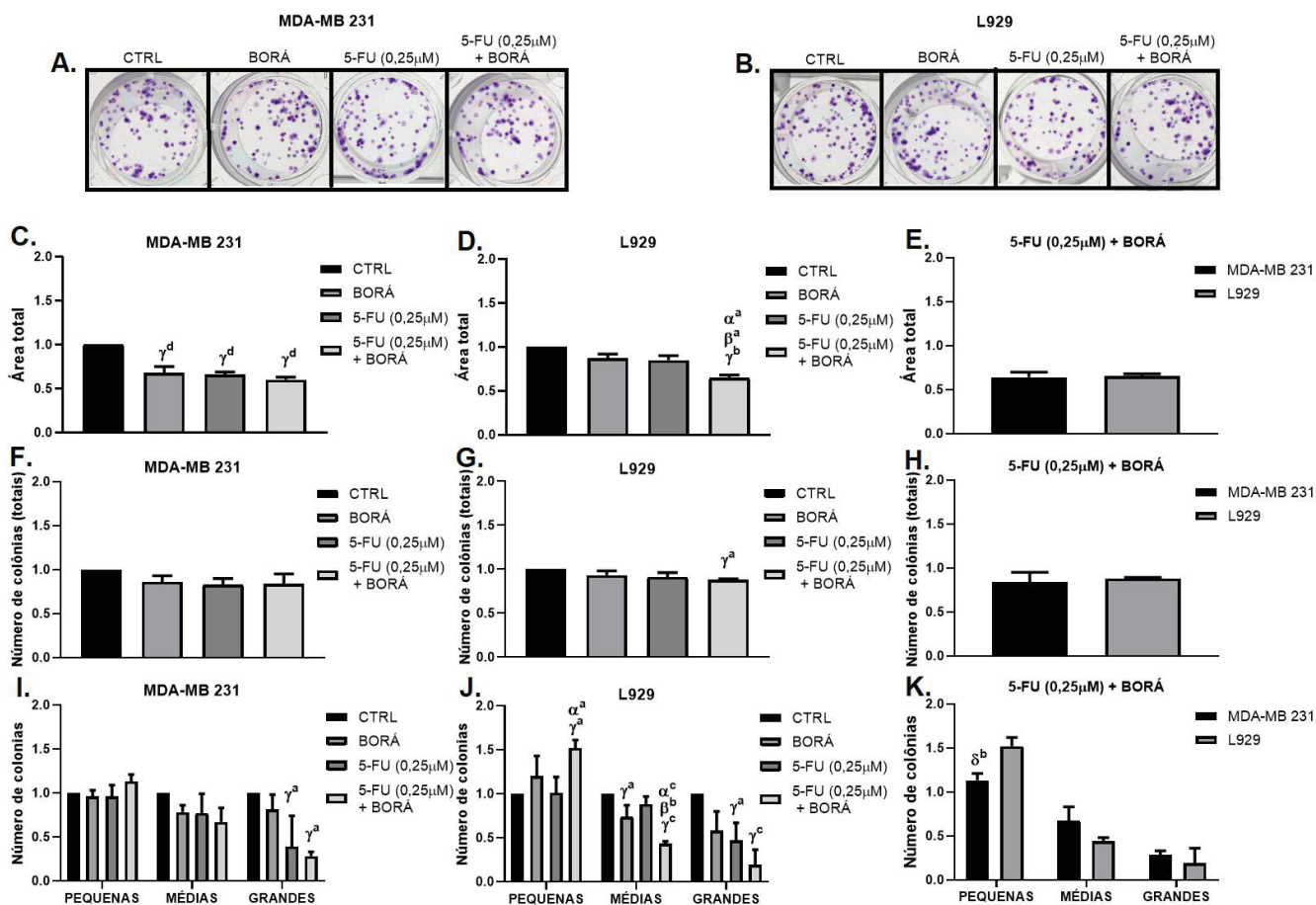
5.5. AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO INDUZIDO PELA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS BORÁ AO 5-FLUOROURACIL SOBRE CÉLULAS MDA-MB-231

Para avaliar a reversibilidade do efeito citotóxico induzido pelo tratamento de células MDA-MB-231 com a associação extrato de própolis 5-FU + BORÁ, sob esquema de pré-tratamento com o própolis, realizou-se o ensaio clonogênico e o *cumulative population doubling* (CPD).

O ensaio do MTT, utilizado neste trabalho para verificar a sensibilidade imediata das células aos efeitos promovidos por BORÁ, 5-FU e associações, mostrou que a associação 5-FU + BORÁ apresentou efeito citotóxico significativo, sendo capaz de reduzir a viabilidade de células MDA-MB-231 em torno de 50 a 60%, quando 5-FU foi aplicado nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e de 2 μ M (Figura 9). Dessa forma, optou-se neste trabalho, em realizar o ensaio clonogênico aplicando-se o fármaco nas concentrações citadas anteriormente.

O ensaio clonogênico trata-se de um teste que avalia a retenção do potencial replicativo de células individualizadas após a exposição das mesmas a um determinado tratamento, podendo indicar, dependendo da forma com que é realizado, se este efeito a longo prazo é decorrente da indução de citotoxicidade ou interferências na proliferação celular (SANTOS *et al.*, 2020). Os resultados obtidos por meio da execução deste teste estão apresentados nas Figuras 18 a 21 (Grupos CTRL e BORÁ apresentam os mesmos valores e fotografias para as quatro figuras).

FIGURA18 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Fotos das colônias de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) após o tratamento com BORÁ (22,51 μ g/mL), 5-FU (0,25 μ M) e 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3. Os gráficos (C), (F) e (I) mostram a área total, o número total e a estratificação de colônias de células MDA-MB-231, respectivamente, após exposição a 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Os gráficos (D), (G) e (J) mostram, respectivamente, o efeito de 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) na área total, número total e na estratificação de colônias constituídas por células L929. Comparação dos valores de área total ocupada pelas colônias, (E) número de colônias totais (H) e estratificação das colônias quanto a seu tamanho (K) entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). α^b e α^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^a e β^b representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao BORÁ. γ^a , γ^b , γ^c e γ^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL). δ^b representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$ em relação a seletividade celular da associação 5-FU 0,25 μ M + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231.

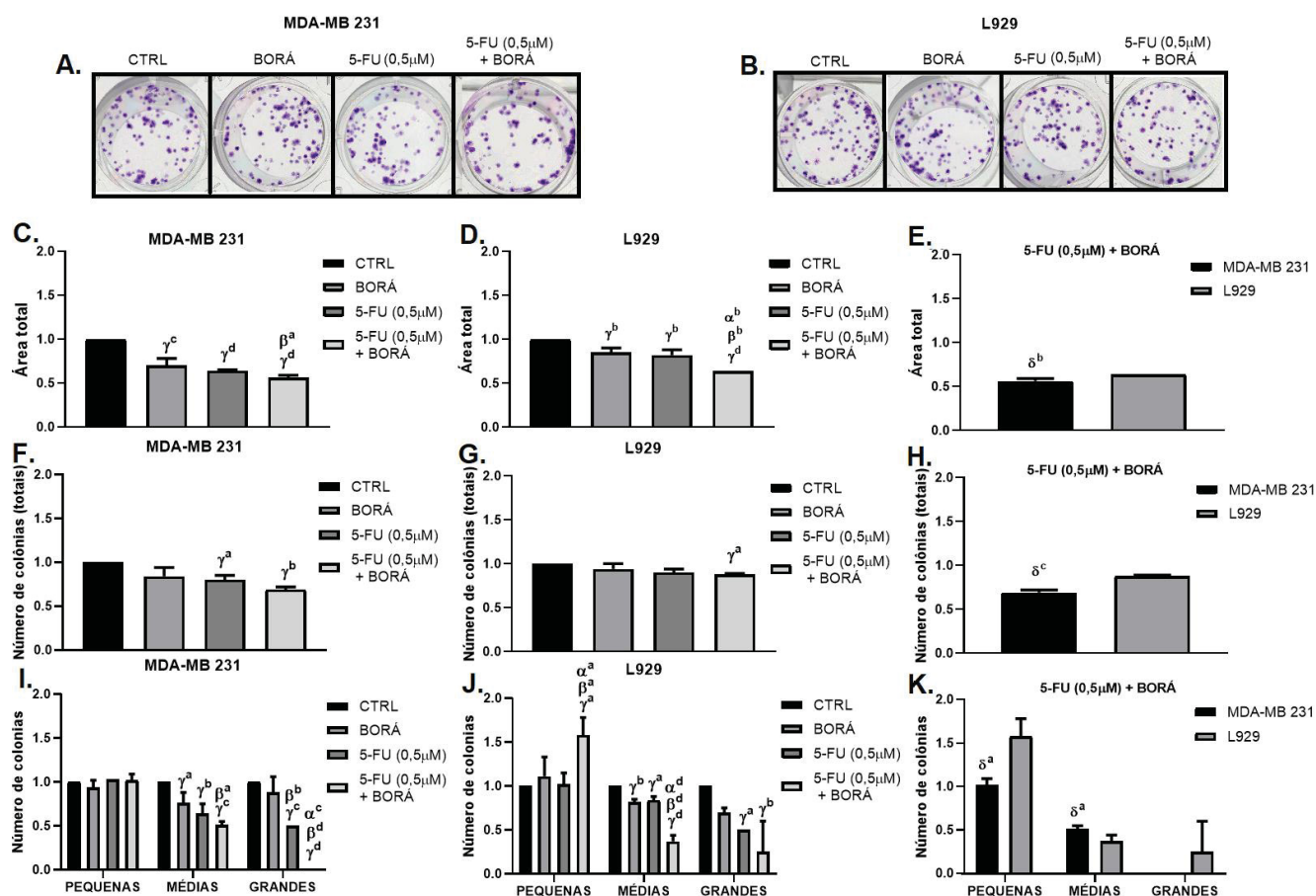
As Figuras 18C e 18F mostram que, em células MDA-MB-231, a associação 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) não foi capaz de reduzir a área total ocupada pelas colônias, bem como o número de clones em relação ao tratamento com BORÁ e 5-FU. Além disso, não foi observada diferença estatística quanto ao tamanho das

colônias, quando compara-se a associação a BORÁ e 5-FU aplicados isoladamente (Figura 18I).

Já em células L929, a combinação 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) reduziu significativamente a área total ocupada pelos clones, tanto em relação ao tratamento com BORÁ, quanto em relação ao tratamento com 5-FU (Figura 18D). Tal efeito pode ser associado a atividade antiproliferativa exercida pela associação neste tipo celular, uma vez que a estratificação das colônias quanto ao seu tamanho, evidenciou significativa redução de clones médios, em comparação ao tratamento com BORÁ, bem como elevação significativa de clones pequenos, comparando-se os resultados da associação ao do tratamento com 5-FU (Figura J). Ainda, não foi verificada redução do número de colônias, em relação ao tratamento com BORÁ e 5-FU, o que demonstra que a potencialização do efeito anticlonogênico promovido pela combinação 5-FU (0,25 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) não se deve a interferências na capacidade de adesão de células L929 (Figura 18G).

Por fim, quando compara-se os efeitos induzidos pela associação em células MDA-MB-231 e L929, apesar de tal combinação ter elevado o número de clones pequenos em células L929 (Figura 18K), não observou-se diferença estatística em relação a área total ocupada pelas colônias, o que indica que a associação afetou o potencial clonogênico de ambas linhagens de maneira semelhante (Figura 18E). Além disso, não foi observada diferença estatística no número de colônias, mostrando que a associação, afeta de forma semelhante ambos tipos celulares quanto a interferências na capacidade de adesão celular (Figura 18H).

FIGURA 19 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Fotos das colônias de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) após o tratamento com BORÁ (22,51 μ g/mL), 5-FU (0,5 μ M) e 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3. Os gráficos (C), (F) e (I) mostram a área total, o número total e a estratificação de colônias de células MDA-MB-231, respectivamente, após exposição a 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Os gráficos (D), (G) e (J) mostram, respectivamente, o efeito de 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) na área total, número total e na estratificação de colônias constituídas por células L929. Comparação dos valores de área total ocupada pelas colônias, (E) número de colônias totais (H) e estratificação das colônias quanto a seu tamanho (K) entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). $\alpha^a, \alpha^b, \alpha^c$ e α^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^a, β^b e β^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao BORÁ. $\gamma^a, \gamma^b, \gamma^c$ e γ^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL). δ^a, δ^b e δ^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação a seletividade celular da associação 5-FU 0,5 μ M + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231.

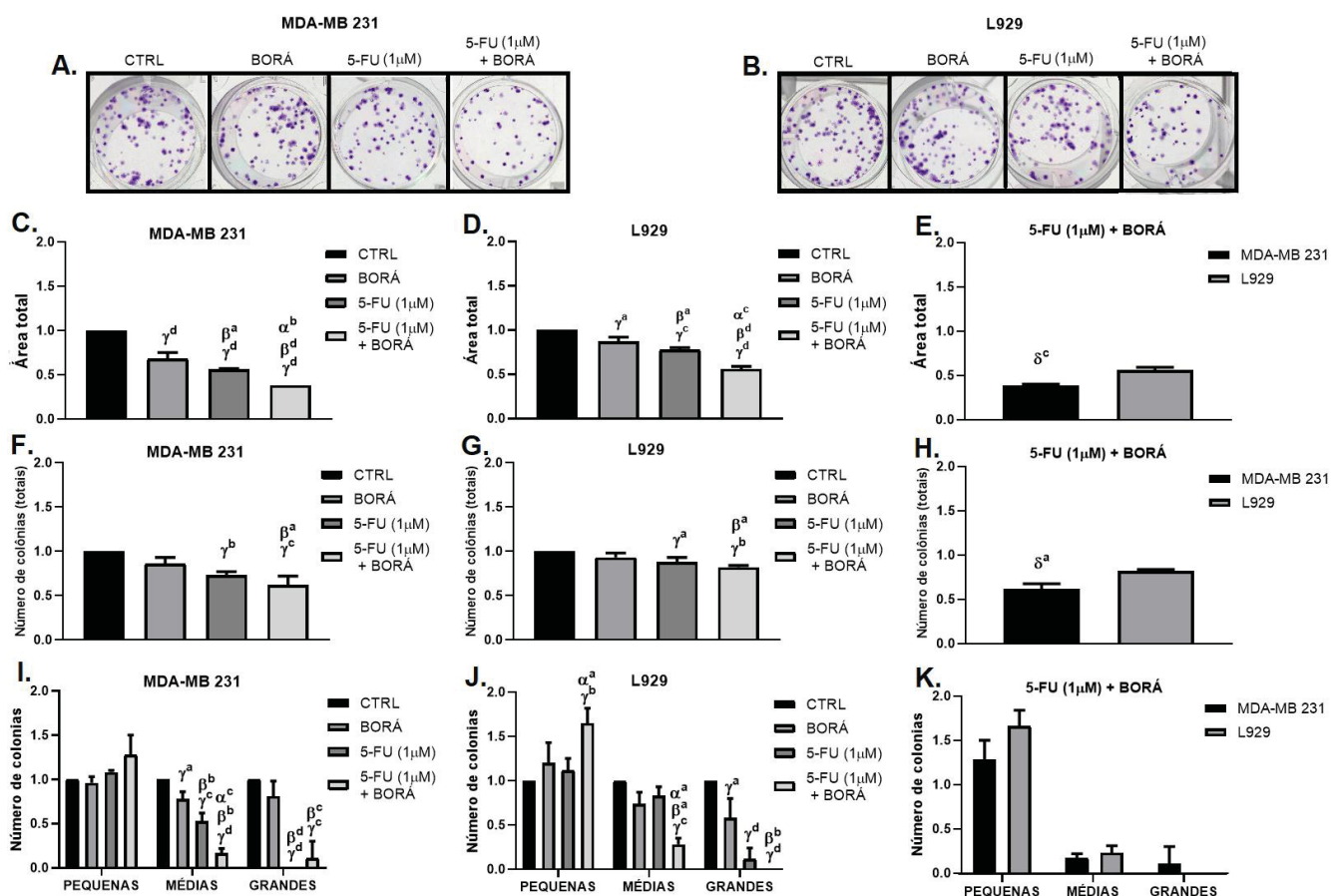
Como pode-se observar na Figura 19, em células MDA-MB-231, a associação 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) reduziu a área ocupada pelas colônias em relação ao tratamento com BORÁ, mostrando que a combinação apresentou efeito anticlonogênico quando comparada ao própolis (Figura 19C). Pode-se observar que

tal efeito deve-se a ação antiproliferativa da associação, uma vez que tal combinação reduziu significativamente o número de clones médios e grandes, em relação a BORÁ (Figura 19I). Apesar da associação 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) ter reduzido o número de clones grandes, quando comparado ao efeito promovido por 5-FU, esta não foi capaz de potencializar o efeito anticlonogênico induzidos por esse tratamento aplicado de forma isolada, uma vez que não foi observada diferença significativa na área total ocupada pelas colônias, comparando-se a associação a este controle.

Já em células L929, a combinação 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) foi capaz de reduzir de maneira significativa, o potencial clonogênico em relação ao tratamento com BORÁ e 5-FU (Figura 19D). Uma vez que não foi observada diferença estatística entre a associação e o tratamento com o própolis e o antimetabólito, em relação ao número total de colônias (Figura 19G), sugere-se que tal efeito anticlonogênico é decorrente da indução de efeito antiproliferativo, que foi evidenciado pelo aumento de clones pequenos e diminuição do número de colônias médias, comparando-se a associação a estes dois tratamentos (Figura 19J).

Por fim, foi demonstrado que a associação 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) promoveu redução significativa na área total ocupada pelas colônias, bem como no número total de clones na linhagem tumoral, em comparação aos fibroblastos (Figuras 19E e 19H). Esse resultado mostra que a combinação promoveu efeito anticlonogênico seletivo, indicado pela redução da área total ocupada pelas colônias. Como observou-se a redução no número total de clones, o efeito anticlonogênico da combinação, deve-se ao fato de a mesma ter interferido de forma mais proeminente, na capacidade adesiva de células de carcinoma mamário, do que na de células não tumorais. Ainda, os resultados obtidos mostram que a associação 5-FU (0,5 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) apresentou maior efeito antiproliferativo nos fibroblastos, do que em células MDA-MB-231, evidenciado pelo acúmulo de clones pequenos e redução de clones médios (Figura 19K). Apesar da associação ter promovido tal efeito antiproliferativo, este não foi significativo o suficiente para superar a magnitude dos efeitos causados pela associação nas células tumorais, o que justifica a seletividade de efeito anticlonogênico anteriormente citada.

FIGURA 20 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.



FONTE: A autora (2022).

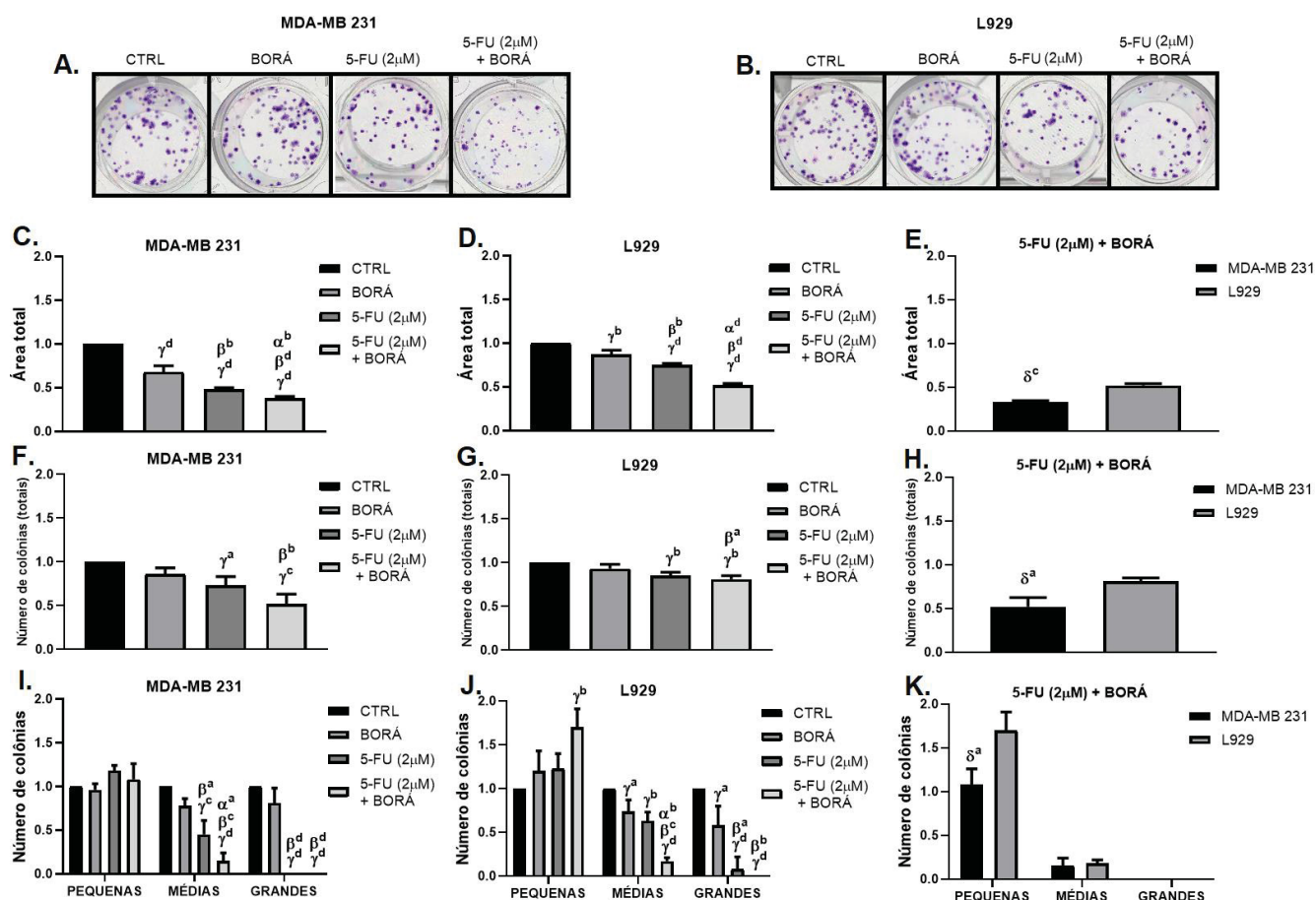
LEGENDA: Fotos das colônias de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) após o tratamento com BORÁ (22,51 μ g/mL), 5-FU (1 μ M) e 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3. Os gráficos (C), (F) e (I) mostram a área total, o número total e a estratificação de colônias de células MDA-MB-231, respectivamente, após exposição a 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Os gráficos (D), (G) e (J) mostram, respectivamente, o efeito de 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) na área total, número total e na estratificação de colônias constituídas por células L929. Comparação dos valores de área total ocupada pelas colônias, (E) número de colônias totais (H) e estratificação das colônias quanto a seu tamanho (K) entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). α^a , α^b e α^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^a , β^b , β^c e β^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente, em relação ao BORÁ. γ^a , γ^b , γ^c e γ^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL). δ^a e δ^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,001$ em relação a seletividade celular da associação 5-FU 1 μ M + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231.

A Figura 20 mostra que a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) promoveu efeitos semelhantes em células MDA-MB-231 e L929. Foi demonstrado que tal combinação foi capaz de reduzir o número de clones em relação ao tratamento com BORÁ em ambos tipos celulares (Figuras 20F e 20G). Ainda, verificou-se que a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) foi capaz de induzir a ocorrência de

efeito anticlonogênico, tanto na linhagem tumoral, quanto na linhagem não tumoral, em relação ao tratamento com BORÁ e 5-FU, uma vez que tal combinação foi capaz de reduzir de forma significativa, a área total ocupada pelos clones comparando-se os efeitos causados pela mesma em relação aos promovidos pelo própolis e pelo fármaco aplicados isoladamente (Figuras 20C e 20D). Ainda, a estratificação dos clones quanto ao seu tamanho, demonstrou que a redução da área total ocupada pelas colônias causada pela combinação deve-se a indução de efeito antiproliferativo, evidenciada principalmente pela redução de clones médios, uma vez que foi observada diferença estatística no número desse tipo de colônia, comparando-se o efeito induzido pela associação, ao causado por BORÁ e 5-FU (Figuras 20I e 20J). Em relação ao tratamento com BORÁ, a ação antiproliferativa da associação se deve também, à redução de clones grandes.

Por fim, ainda foi demonstrado que o efeito anticlonogênico promovido pela combinação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) foi seletivo para as células tumorais, uma vez que observou-se diferença significativa na área total ocupada pelos clones quando compara-se o efeito induzido pela associação em células MDA-MB-231 e L929 (Figura 20E). Como observou-se diferença estatística no número de clones, quando compara-se o efeito promovido pela associação na linhagem tumoral e nos fibroblastos, sugere-se que tal seletividade está relacionada ao fato de a associação ter causado interferências na adesão de células (Figura 20H), as quais podem estar associadas ao efeito citotóxico inicial promovido pela combinação, o qual foi mais efetivo nas células tumorais sobreviventes (Figura 9), acarretando em menor adesão e levando, conseqüentemente, a redução do número de colônias, quando comparado ao efeito causado em células não tumorais. Nesse caso, a redução seletiva da área total ocupada pelos clones promovido pela combinação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) sobre a linhagem tumoral, não pode ser atribuída a maior ou menor indução de efeito antiproliferativo, uma vez que a estratificação das colônias quanto ao seu tamanho não demonstrou diferença estatística em relação ao número de clones independentemente de seu tamanho, comparando-se o efeito promovido pela associação nas células de carcinoma mamário, ao induzido nos fibroblastos (Figura 20 K).

FIGURA 21 - Avaliação da formação e crescimento de colônias, após o tratamento com associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Fotos das colônias de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) após o tratamento com BORÁ (22,51 μ g/mL), 5-FU (2 μ M) e 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3. Os gráficos (C), (F) e (I) mostram a área total, o número total e a estratificação de colônias de células MDA-MB-231, respectivamente, após exposição a 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Os gráficos (D), (G) e (J) mostram, respectivamente, o efeito de 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) na área total, número total e na estratificação de colônias constituídas por células L929. Comparação dos valores de área total ocupada pelas colônias, (E) número de colônias totais (H) e estratificação das colônias quanto a seu tamanho (K) entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). α^a , α^b e α^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^a , β^b , β^c e β^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente, em relação ao BORÁ. γ^a , γ^b , γ^c e γ^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL). δ^a e δ^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,001$ em relação a seletividade celular da associação 5-FU 2 μ M + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231.

Os resultados obtidos e demonstrados na Figura 21, mostram que a associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) promoveu efeitos semelhantes a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 e L929. A associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) foi capaz de potencializar o efeito anticlonogênico

de BORÁ e de 5-FU, ao reduzir significativamente a área ocupada pelas colônias, quando comparado ao efeito promovido por esses controles (Figuras 21C e 21D). Em relação ao tratamento com BORÁ, a redução desse parâmetro pode ser atribuída ao fato de a combinação ter interferido na adesão celular, bem como ter induzido a ocorrência de efeito antiproliferativo, visto a redução significativa no número de total colônias (Figuras 21F e 21G), bem como no número de clones médios e grandes (Figuras 21I e 21J), quando compara-se os valores obtidos após o tratamento das células com a associação, aos obtidos posteriormente ao tratamento com o própolis. Novamente, sugere-se que as interferências na adesão celular pela associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), são decorrentes do efeito citotóxico previamente caracterizado pelo ensaio do MTT (Figura 9). Em relação ao tratamento com 5-FU, a redução da área total ocupada pelas colônias (Figura 21C e 21D) deve-se apenas a indução de efeito antiproliferativo, o que foi visualizado pela redução do número de colônias médias comparando-se a associação com o antimetabólito.

Por fim, embora a associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) tenha promovido significativo efeito anticlonogênico em células L929, tal ação é seletiva para a linhagem MDA-MB-231. A seletividade de efeito pode ser atribuída a maiores interferências na adesão celular causada pela associação nas células de carcinoma de mama em comparação ao efeito promovido nos fibroblastos (Figura 21H), sendo esta relacionada ao efeito citotóxico inicial promovido pela associação (Figura 9). Ainda, a análise da figura de estratificação das colônias quanto ao seu tamanho, demonstra que na linhagem L929 a combinação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) promoveu maior efeito antiproliferativo, quando comparado ao efeito induzido nas células tumorais. Dessa forma, sugere-se que, apesar de a associação ter promovido efeito antiproliferativo superior em células L929, do que na linhagem tumoral, tal ação não foi suficiente para superar as interferências promovidas pela combinação nas células tumorais, as quais são decorrentes de seu efeito citotóxico, justificando o menor potencial clonogênico em células MDA-MB-231.

Resumidamente, o *screening* por meio da realização do ensaio clonogênico demonstrou que as combinações mais efetivas a longo prazo, tratam-se daquelas em que células MDA-MB-231 e L929 foram pré-tratadas com BORÁ (22,51 μ g/mL) e posteriormente expostas a 5-FU nas concentrações de 1 μ M e de 2 μ M, uma vez que observou-se a indução de efeito anticlonogênico seletivo em ambas associações,

sendo que o efeito anticlono gênico induzido pela combinação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 está associado apenas a promoção de efeito antiproliferativo, enquanto que o causado pela associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) está relacionado a indução de atividade antiproliferativa e interferências na adesão celular (Figuras 20E e 21H).

O CPD é um ensaio a longo prazo, que avalia a taxa de duplicação das células, fornecendo informações sobre a cinética de proliferação celular durante e após a exposição das células aos tratamentos e/ou compostos teste, tendo grande valia para estudos relacionados ao câncer (SILVA *et al.*, 2016a). Nesse ensaio, a cinética de proliferação das células pode ser avaliada pelo estabelecimento de 4 parâmetros: o CPD final relativo (RendCPD), a área relativa sob a curva (rAUC), a taxa de proliferação celular (RPR) e o tempo relativo para alcançar um determinado CPD (RTCT) (SILVA *et al.*, 2016).

Nesse sentido, o RendCPD tem como objetivo comparar o efeito final de um tratamento ao controle, levando-se em consideração o valor de CPD correspondente ao último dia de um ciclo de tratamento. A rAUC por sua vez, representa o efeito global de um tratamento, ou seja, mensura a redução do tamanho da população induzida pelo tratamento, levando em consideração o efeito citotóxico e/ou antiproliferativo inicial, bem como a restauração da capacidade proliferativa a longo prazo das células sobreviventes. O RTCT indica a capacidade de um tratamento em retardar a proliferação celular, levando em consideração a ação citotóxica/citostática inicial, concomitantemente à velocidade de proliferação celular. Por fim, o RPR verifica a capacidade de um tratamento em alterar a velocidade de proliferação das células sobreviventes, podendo sugerir o surgimento de subclones resistentes ao tratamento. Se transportado para a clínica, o RPR pode indicar o momento em que uma nova dose de fármaco/esquema terapêutico deve ser aplicada para evitar o desenvolvimento de resistência. Cabe ressaltar que os dois últimos parâmetros citados anteriormente (RPR e RTCT) são calculados apenas quando uma população que sobrevive a um determinado tratamento reestabelece sua capacidade proliferativa (SILVA *et al.*, 2016a; SILVA *et al.*, 2016b).

Além do estabelecimento de propriedades relacionadas a cinética de crescimento das células mencionadas anteriormente, outra vantagem do CPD em relação ao ensaio clonogênico refere-se ao tempo de realização do ensaio e/ou análises. No ensaio clonogênico este tempo é limitado pela observação da formação

de colônias (FRANKEN *et al.*, 2006). Já no CPD, a duração do ensaio é flexível, sendo delimitada pelo próprio pesquisador, o qual estabelece os critérios mais apropriados para avaliar a resposta pretendida e finalizar sua execução (SILVA *et al.*, 2016a).

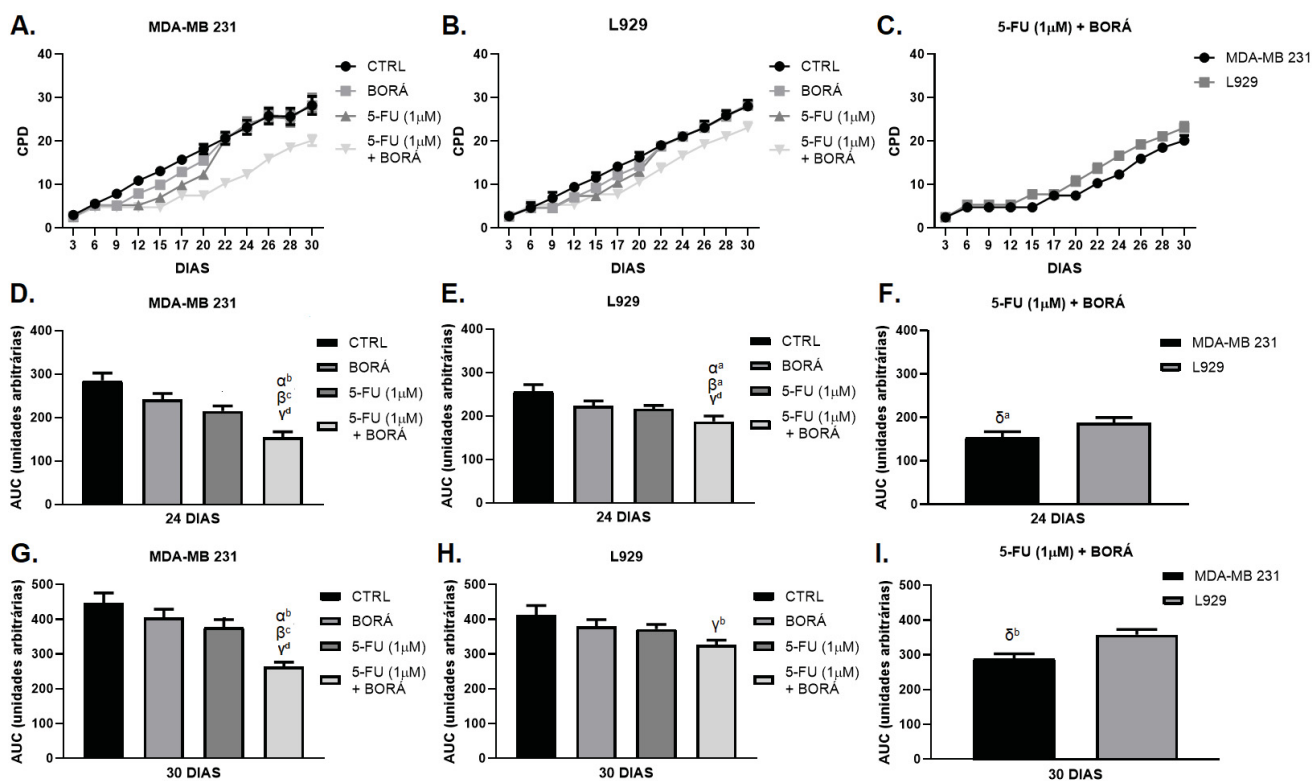
Como mencionado anteriormente, os resultados obtidos por meio da realização do *screening* via ensaio clonogênico mostraram que os tratamentos mais efetivos a longo prazo foram aqueles em que BORÁ foi associado a 5-FU nas concentrações de 1 e de 2 μM . Dessa forma, os parâmetros do CPD (AUC, RendCPD, RPR e RTCT) foram estabelecidos apenas para avaliar o efeito induzido por essas combinações na cinética de crescimento de células tumorais e não tumorais.

Além disso, é pertinente ressaltar que os parâmetros do CPD foram determinados em dois períodos: no 24º e no 30º dia. O 24º dia do CPD corresponde ao último dia de um ciclo de tratamento com 5-FU aplicado sob os seguintes regimes terapêuticos: 1- ciclofosfamida (600 mg/m^2 , dia 1, via intravenoso) + metotrexato (40 mg/m^2 , dia 1, via intravenoso) + 5-FU (600 mg/m^2 , dia 1, via intravenoso), conhecido como CMF-IV, cuja readministração dos fármacos se faz em um intervalo de 3 semanas, num total de 9 aplicações (SBOC, 2022a) e 2- 5-FU (600 mg/m^2 , dia 1, via intravenoso) + epirrubicina (90 mg/m^2 , dia 1, via intravenoso) + ciclofosfamida (600 mg/m^2 , dia 1, via intravenoso), conhecido como (F) EC90, onde a reaplicação dos fármacos ocorre após um intervalo de 3 semanas, num total de 4 ciclos (SBOC, 2022b). Tais esquemas terapêuticos são aplicados para câncer de mama localizado em terapia adjuvante e neoadjuvante, respectivamente, e tumores classificados como triplo negativos e RH+/HER2 negativos (SBOC, 2022a; SBOC, 2022b). Ainda, é pertinente ressaltar que a aplicação de CMF também é realizada em doença avançada, ou seja, carcinoma mamário metastático resistente a antraciclinas e resistente concomitantemente a antraciclinas e taxanos. Como mencionado anteriormente, este tratamento é administrado para pacientes que apresentam tumores do tipo triplo negativo e luminal (RH+/HER2 negativo) (SBOC, 2022c).

A avaliação do CPD também foi realizada no 30º dia, onde finalizou-se o ensaio, visto que nesse intervalo de tempo o tratamento com 5-FU alcançou o mesmo valor de CPD que o controle. Tal análise teve 2 objetivos: verificar a manutenção dos efeitos a longo prazo promovidos pela associação 5-FU+BORÁ quando as células tivessem se recuperado totalmente dos efeitos induzidos apenas pelo antimetabólito; e verificar

se o pré-tratamento das células com própolis sensibilizariam estas a ação do 5-FU por um maior intervalo tempo, a fim de sugerir uma extensão do intervalo de tempo entre dois ciclos de quimioterapia. Os resultados obtidos foram mostrados nas Figuras 22 e 23.

FIGURA 22 - Avaliação da cinética de crescimento celular, após o tratamento com associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.



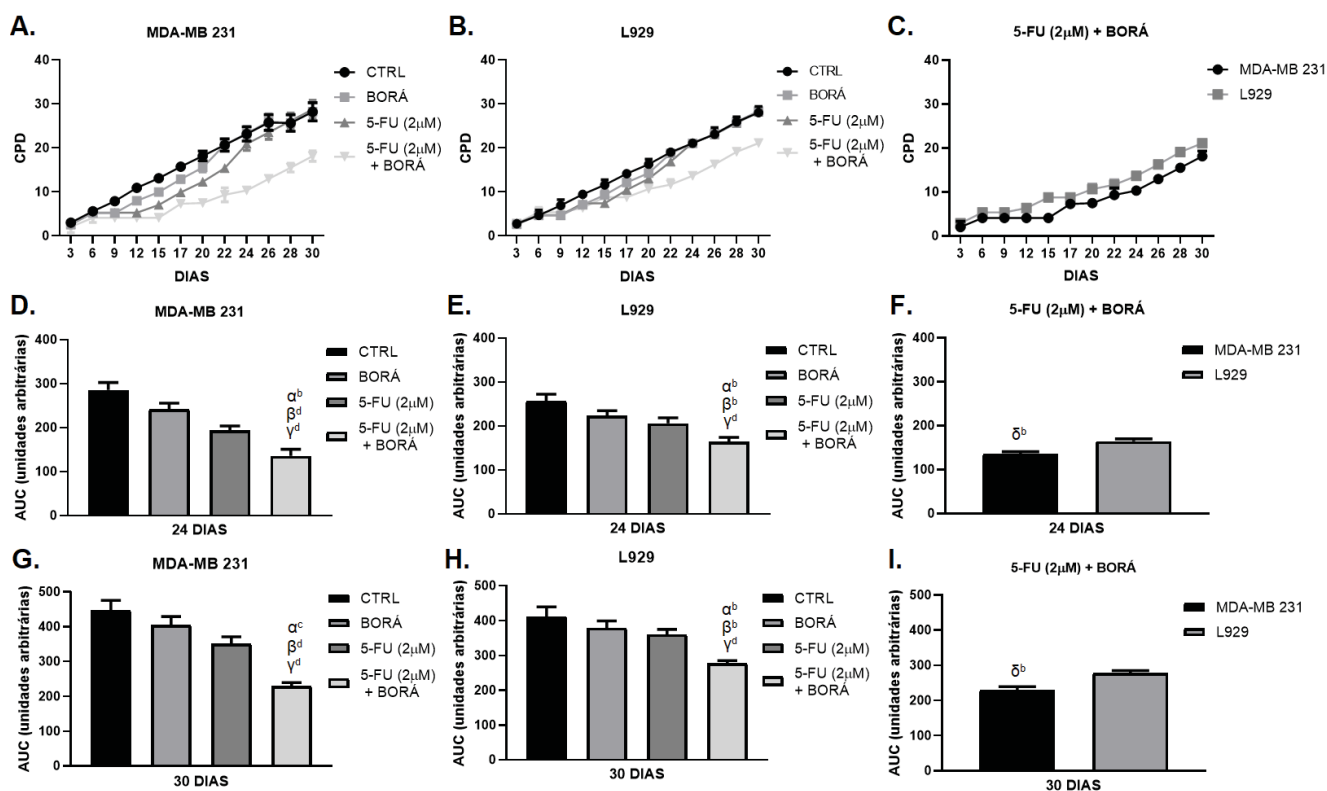
FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Gráficos de CPD de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) mostram o perfil de proliferação celular ao longo de 30 dias, após o tratamento com BORÁ (22,51 μ g/mL), 5-FU (1 μ M) e associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL). Comparação das curvas de CPD entre células MDA-MB-231 e L929 após o tratamento com a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) (C). Gráfico da área sob a curva do efeito na cinética de crescimento celular ao longo de 24 dias, após o tratamento com BORÁ (22,51 μ g/mL), 5-FU (1 μ M) e associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 (D) e L929 (E). Comparação dos valores de AUC apresentados ao longo de 24 dias entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) (F). Gráfico da área sob a curva do efeito na cinética de crescimento celular ao longo de 30 dias, após tratamento com BORÁ (22,51 μ g/mL), 5-FU (1 μ M) e 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em células MDA-MB-231 (G) e L929 (H). Comparação dos valores de AUC apresentados ao longo de 30 dias entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) (I). α^a e α^b representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^a e β^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao BORÁ. δ^a e δ^b representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação a seletividade celular da associação 5-FU 1 μ M + BORÁ (22,51 μ g/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231.

Os resultados ilustrados na Figura 22 mostram que em células MDA-MB-231, tanto no 24^o quanto no 30^o dia, a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) reduziu significativamente a AUC em relação ao tratamento individual com BORÁ e

com 5-FU (Figura 22D e 22G). Já em células L929, apenas no 24º dia após o tratamento, observou-se redução significativa da AUC em relação a BORÁ e 5-FU (Figura 22E). Ainda, verificou-se que a associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) apresentou efeito antiproliferativo seletivo a longo prazo sobre a linhagem tumoral, em ambos intervalos de tempo avaliados (Figuras 22F e 22I).

FIGURA 23 - Avaliação da cinética de crescimento celular, após o tratamento com associação 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL), seguindo esquema de pré-tratamento.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Gráficos de CPD de células MDA-MB-231 (A) e L929 (B) mostram o perfil de proliferação celular ao longo de 30 dias, após o tratamento com BORÁ (22,51 µg/mL), 5-FU (2 µM) e associação 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL). Comparação das curvas de CPD entre células MDA-MB-231 e L929 após o tratamento com a associação 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) (C). Gráfico da área sob a curva do efeito na cinética de crescimento celular ao longo de 24 dias, após o tratamento com BORÁ (22,51 µg/mL), 5-FU (2 µM) e associação 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) em células MDA-MB-231 (D) e L929 (E). Comparação dos valores de AUC apresentados ao longo de 24 dias entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) (F). Gráfico da área sob a curva do efeito na cinética de crescimento celular ao longo de 30 dias, após tratamento com BORÁ (22,51 µg/mL), 5-FU (2 µM) e 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) em células MDA-MB-231 (G) e L929 (H). Comparação dos valores de AUC apresentados ao longo de 30 dias entre células MDA-MB-231 e L929 tratadas com 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) (I). α^b e α^c representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao 5-FU. β^b e β^d representam diferenças estatisticamente significativas de $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao BORÁ. δ^b representa diferença estatisticamente significativa de $p < 0,01$, em relação a seletividade celular da associação 5-FU 2 µM + BORÁ (22,51 µg/mL) em L929 comparando-a com MDA-MB-231

Por fim, a Figura 23 mostra que, embora a associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) tenha reduzido significativamente a AUC de células MDA-MB-231 e L929 em ambos intervalos de tempo avaliados (Figuras 23D, 23G, 23E e 23H), tal associação apresentou efeito citostático seletivo a longo prazo sobre a linhagem tumoral.

Com o objetivo de avaliar de forma mais aprofundada a cinética de crescimento das células MDA-MB-231 e L929 após sua exposição as associações 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) e 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), também foram determinados os demais parâmetros do CPD (RendCPD, RPR e RTCT), os quais estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - Valores dos parâmetros do CPD (Cumulative Population Doubling) : RendCPD (Relative end CPD), RPR (Relative Proliferation Rate) e RTCT (Relative Time to Cross a Threshold).

MDA-MB- 231										
24 dias										
Tratamento	RendCPD			RPR			RTCT			
	RendCPD _{CTRL}	RendCPD _{BORÁ}	RendCPD _{5-FU}	RPR _{CTRL}	RPR _{BORÁ}	RPR _{5-FU}	RTCT _{CTRL}	RTCT _{BORÁ}	RTCT _{5-FU}	
BORÁ	1,00	1,00	ND	1,25	1,00	ND	0,81	1,00	ND	
5-FU (1µm) + BORÁ	1,03	ND	1,00	1,71	ND	1,00	0,67	ND	1,00	
5-FU (1µm) + BORÁ	0,56	0,55	0,54	0,80	0,64	0,47	0,54	0,66	0,80	
5-FU (2µm)	0,91	ND	1,00	1,28	ND	1,00	0,65	ND	1,00	
5-FU (2µm) + BORÁ	0,47	0,47	0,52	0,64	0,51	0,50	0,49	0,60	0,75	
30 dias										
Tratamento	RendCPD			RPR			RTCT			
	RendCPD _{CTRL}	RendCPD _{BORÁ}	RendCPD _{5-FU}	RPR _{CTRL}	RPR _{BORÁ}	RPR _{5-FU}	RTCT _{CTRL}	RTCT _{BORÁ}	RTCT _{5-FU}	
BORÁ	1,00	1,00	ND	1,19	1,00	ND	0,88	1,00	ND	
5-FU (1µm)	1,00	ND	1,00	1,55	ND	1,00	0,79	ND	1,00	
5-FU (1µm) + BORÁ	0,73	0,72	0,72	1,33	1,11	0,86	0,61	0,69	0,77	
5-FU (2µm)	1,02	ND	1,00	1,41	ND	1,00	0,77	ND	1,00	
5-FU (2µm) + BORÁ	0,66	0,66	0,65	1,09	0,91	0,77	0,57	0,65	0,74	
L929										
24 dias										
Tratamento	RendCPD			RPR			RTCT			
	RendCPD _{CTRL}	RendCPD _{BORÁ}	RendCPD _{5-FU}	RPR _{CTRL}	RPR _{BORÁ}	RPR _{5-FU}	RTCT _{CTRL}	RTCT _{BORÁ}	RTCT _{5-FU}	
BORÁ	1,00	1,00	ND	1,24	1,00	ND	0,79	1,00	ND	
5-FU (1µm)	1,03	ND	1,00	1,15	ND	1,00	0,78	ND	1,00	
5-FU (1µm) + BORÁ	0,80	0,80	0,78	0,95	0,77	0,83	0,77	0,98	0,99	
5-FU (2µm)	1,00	ND	1,00	1,47	ND	1,00	0,67	ND	1,00	
5-FU (2µm) + BORÁ	0,67	0,67	0,66	0,71	0,58	0,49	0,61	0,78	0,92	
30 dias										
Tratamento	RendCPD			RPR			RTCT			
	RendCPD _{CTRL}	RendCPD _{BORÁ}	RendCPD _{5-FU}	RPR _{CTRL}	RPR _{BORÁ}	RPR _{5-FU}	RTCT _{CTRL}	RTCT _{BORÁ}	RTCT _{5-FU}	
BORÁ	1,01	1,00	ND	1,23	1,00	ND	0,90	1,00	ND	
5-FU (1µm)	1,02	ND	1,00	1,34	ND	1,00	0,88	ND	1,00	
5-FU (1µm) + BORÁ	0,83	0,82	0,82	1,12	0,92	0,84	0,77	0,85	0,88	
5-FU (2µm)	1,01	ND	1,00	1,37	ND	1,00	0,85	ND	1,00	
5-FU (2µm) + BORÁ	0,76	0,75	0,76	1,26	1,02	0,92	0,69	0,77	0,81	

FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Razão dos parâmetros do CPD analisados no 24° e no 30° dia, determinados entre células MDA-MB-231 e L929 após esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3 com BORÁ, 5-FU (1 – 2 µM) e combinação 5-FU (1 – 2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL).

Pode-se observar que o tratamento de células MDA-MB-231 com as associações 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) e 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) foi capaz de reduzir o RendCPD e o RTCT (Tabela 6) no 24º e 30º dia, tanto em relação ao controle, quanto em relação aos tratamentos com BORÁ e 5-FU aplicados isoladamente. Tais dados corroboram a diminuição da AUC (Figuras 22 e 23) apresentada anteriormente, mostrando que as combinações são capazes de retardar a proliferação deste tipo celular a longo prazo. No que se refere ao RPR, pode-se observar que no 24º dia, as células tratadas com as associações ainda não haviam recuperado totalmente sua capacidade proliferativa, visto a determinação de valores de RPR inferiores ao CTRL, BORÁ e 5-FU. Já no 30º dia pode-se observar a obtenção de valores de RPR superiores a 1,00 em todos os tratamentos, quando comparados ao controle. Tal dado mostra que em um determinado momento entre o 24º e o 30º dia, tais células restabeleceram sua capacidade proliferativa, apresentando velocidade de proliferação superior a apresentada pelo CTRL (Tabela 6).

Os valores de RPR obtidos com as associações em relação aos controles BORÁ e 5-FU, devem ser interpretados com cautela. Deve-se verificar que, a redução em alguns valores de RPR observadas no 30º dia, não está relacionada ao fato de as combinações terem diminuído a taxa de proliferação, mas sim ao fato de que o tratamento de células MDA-MB-231 com BORÁ ou 5-FU terem elevado de forma mais significativa tal velocidade. Este dado é bem visualizado quando compara-se os valores de RPR relacionados ao CTRL, o qual representa a velocidade de proliferação fisiológica desse tipo celular (Tabela 6).

Avaliando-se todos os parâmetros do CPD de maneira conjunta, pode-se sugerir que a capacidade das combinações em retardar a proliferação de células MDA-MB-231 se deve principalmente ao efeito citotóxico inicial exercido pelas mesmas (efeito imediato), sendo essa ação suficiente para desacelerar o crescimento mesmo em células que restauraram a velocidade normal de proliferação, impedindo que estas atingissem o mesmo valor de CPD que CTRL, BORÁ e 5-FU até o 30º dia de experimento.

Nesse sentido, salienta-se que células MDA-MB-231 tratadas com as associações 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) e 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) em um determinado

momento atingirão os mesmos valores de CPD que o CTRL, BORÁ e 5-FU, em decorrência da restauração da velocidade de proliferação, mostrando, como mencionado anteriormente, a capacidade das células de se recuperarem do (s) dano (s) causado (s) pelos tratamentos. Este comportamento celular já era esperado, visto que o CPD, como realizado neste estudo, acabou tentando mimetizar o que aconteceria com uma população de células tumorais submetidas ao 1º ciclo de tratamento, o qual foi propositalmente estendido. Assim, tendo como base a própria biologia tumoral, onde células neoplásicas, por apresentarem vários mecanismos de resistência, incluindo aqueles que implicam na ativação exacerbada de vias de proliferação e sobrevivência, bem como de mecanismos de reparo (NEDELJKOVIĆ; DAMJANOVIĆ, 2019), esperava-se a ocorrência de recuperação celular ao (s) dano (s) induzido (s) pelos tratamentos ao longo do tempo após a retirada do estímulo estressor. Ainda, cabe ressaltar que não foi possível estabelecer precisamente o dia de total recuperação celular, uma vez que esta ocorrerá em um período maior que o avaliado experimentalmente.

Por fim, neste momento é pertinente destacar que o restabelecimento da velocidade de proliferação não invalida os resultados obtidos, uma vez que foi verificado significativo retardo no crescimento e recuperação celular no 24º dia da curva de crescimento, dia este em que é finalizado um ciclo de quimioterapia com 5-FU utilizando-se os esquemas terapêuticos CMF-EV e (F) EC90, citados anteriormente. A recuperação da taxa proliferativa observada no 30º dia indica que o intervalo de tempo entre dois ciclos de quimioterapia nesse caso, não poderia ser estendido além do 24º dia. Por fim, a análise do 30º dia mostra que a recuperação total de células expostas ao 5-FU coincide com a recuperação parcial de células expostas as associações 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) e 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL), onde embora observe-se restauração total da capacidade proliferativa das mesmas, ainda não foi observado o restabelecimento do crescimento celular a ponto de atingir os mesmos valores de CPD do CTRL, BORÁ e 5-FU (Figura 22 e 23, Tabela 6).

As análises do 24º e 30º dias revelaram que, nos dois intervalos de tempo, o tratamento de células L929 com a associação 5-FU (1µM) + BORÁ (22,51µg/mL) foi capaz de reduzir o RendCPD, tanto em relação ao controle, quanto em relação aos tratamentos

com BORÁ e 5-FU aplicados isoladamente (Tabela 6). No 24º dia, observou-se redução no RTCT apenas em relação ao CTRL. Já no 30º dia, verificou-se diminuição do RTCT em relação a CTRL, BORÁ e 5-FU. Ainda, em ambos intervalos de tempo, não se observou alterações no RPR quando comparados os valores da associação aos apresentados pelo CTRL (Tabela 6). As únicas alterações observadas no RPR, ocorreram nos dois intervalos de tempo avaliados, quando compara-se o RPR da associação aos dos tratamentos com BORÁ e 5-FU (1µM). Entretanto, tais reduções devem ser desconsideradas, uma vez que, nesses intervalos de tempo, o tratamento de células L929 com BORÁ e 5-FU aplicados isoladamente acarretaram no desenvolvimento de uma velocidade de proliferação mais elevada que a apresentada pela associação e pelo próprio controle, o qual, como mencionado anteriormente, representa a velocidade de proliferação celular fisiológica, ou seja, sem interferências. Assim, sugere-se que a redução do RPR da associação em comparação aos valores apresentados por BORÁ e 5-FU (1µM) se devem a um estímulo na proliferação causado por tais tratamentos e não por uma redução na velocidade de proliferação promovida pela associação.

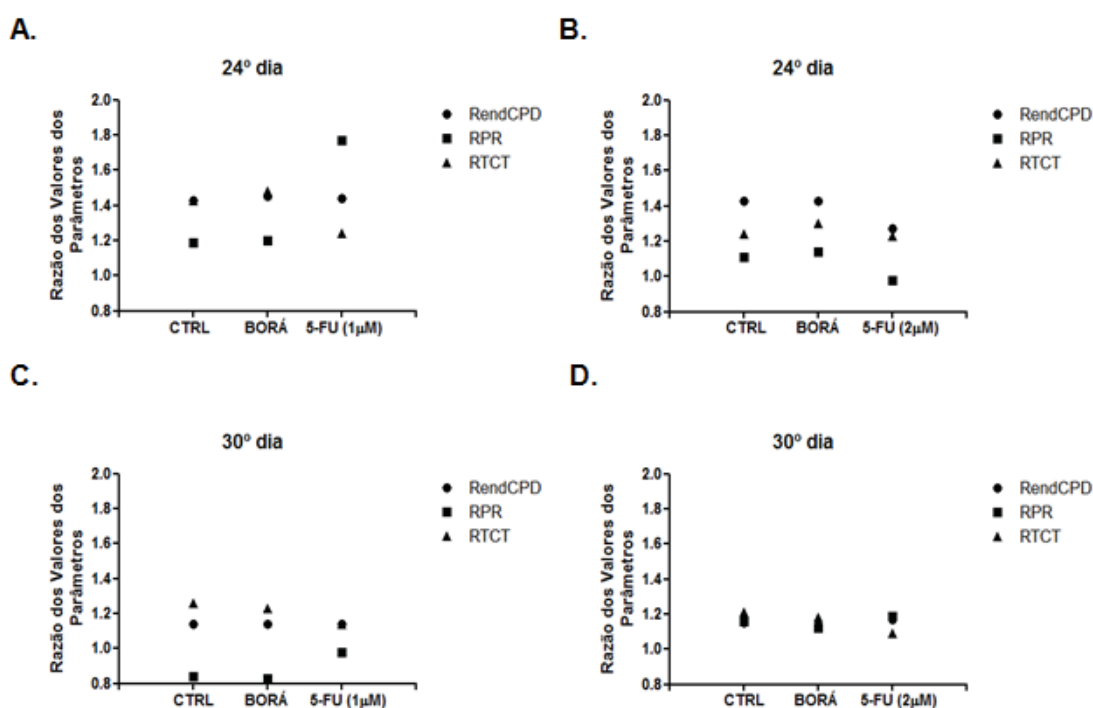
Dessa forma, os dados do CPD em células L929, quando analisados em conjunto, sugerem que o retardo do crescimento celular observado no 24º e 30º dia de tratamento e refletido na redução da AUC, do RendCPD e do RTCT se devem ao efeito citotóxico inicialmente induzido pela associação, que por sua vez não foram significativos o suficiente para manter reduzida a velocidade de proliferação, mostrando que as células readquiriram completamente a capacidade proliferativa ao longo do tempo, nos dois intervalos de tempo avaliados.

Em relação a associação 5-FU (2µM) + BORÁ (22,51 µg/mL), a análise do 24º dia mostrou que tal tratamento reduziu o RendCPD, o RTCT e o RPR em relação aos três controles. Esse dado, quando associado a AUC apresentada anteriormente (Figura 23), demonstra que tal combinação, nesse intervalo de tempo, foi capaz de retardar o crescimento e a recuperação das células, ao afetarem a velocidade de proliferação celular. Nesse caso, sugere-se que o efeito citotóxico e/ou citostático inicial promovido pela associação 5-FU (2µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) foi significativo o suficiente para promover uma redução efetiva da velocidade de proliferação, a qual, juntamente com os efeitos

inicialmente induzidos, colaborou para o retardo do crescimento e recuperação observados (Figura 23, Tabela 6).

Já a análise do 30º dia mostrou que a associação 5-FU (2µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) reduziu a AUC, o RendCPD e o RTCT em relação ao CTRL, BORÁ e 5-FU (2µM), além de não se ter identificado significativa alteração no RPR em relação a esses controles. Assim, sugere-se que as reduções da AUC, do RendCPD e do RTCT se devem ao efeito citotóxico inicialmente induzido pela combinação, que por sua vez não foi significativo o suficiente para manter reduzida a velocidade de proliferação, mostrando que as células readquiriram a capacidade proliferativa ao longo do tempo (Figura 23, Tabela 6).

FIGURA 24 - Efeito seletivo a longo prazo exercido pela associação 5-FU + BORÁ caracterizado pela determinação dos seguintes parâmetros do CPD: RendCPD, RPR e RTCT.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Razão dos parâmetros do CPD determinados entre células L929 e MDA-MB-231 no 24º (A) e 30º dia (B) após a retirada da associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL). Razão dos parâmetros do CPD determinados entre células L929 e MDA-MB-231 no 24º (C) e 30º dia (D) após a retirada da associação 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL). As linhagens celulares foram expostas a BORÁ (22,51 µg/mL), 5-FU (1µM), 5-FU (2 µM), associação 5-FU (1 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) e associação 5-FU (2 µM) + BORÁ (22,51 µg/mL) por 72 h conforme esquema de pré-tratamento descrito no item 4.3.

Quando compara-se os efeitos promovidos pelas associações 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) e 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) no ensaio do CPD em células MDA-MB-231 e L929, e relacionados ao crescimento celular (AUC, RendCPD e RTCT) é evidente que o mesmo foi mais acentuado nas células MDA-MB-231 (Figuras 22 e 23; Tabela 6), mostrando maior susceptibilidade da linhagem tumoral aos tratamentos, em comparação aos efeitos induzidos nos fibroblastos. O único parâmetro variável foi o RPR. Nesse sentido, a análise do 24º dia de tratamento com a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), mostrou que células L929 restauraram sua capacidade proliferativa em função da retirada do tratamento, enquanto células MDA-MB-231 permaneceram apresentando uma velocidade mais baixa de proliferação, mesmo com a retirada do mesmo (Tabela 6). Esses dados justificam a obtenção de um valor de razão de RPR acima de 1 quando compara-se as duas linhagens celulares (Figura 24). Já os dados obtidos após o tratamento das células com a associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), mostraram que células L929 recuperam-se e proliferam-se em maior velocidade que células MDA-MB-231 após a retirada do tratamento, quando compara-se células tumorais e não tumorais em relação ao CTRL e BORÁ, visto a observação de valores de razão de RPR superiores a 1. Por fim, verificou-se que células L929 e MDA-MB-231 apresentaram velocidade de proliferação semelhante após a retirada do tratamento, comparando-se células tumorais e não tumorais ao 5-FU (2 μ M), uma vez que observa-se um valor de razão de RPR muito próximo de 1 (Figura 24, Tabela 6).

A análise do 30º dia mostra que, em relação a exposição a associação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), células MDA-MB-231 apresentaram uma velocidade de proliferação mais elevada do que a das células não tumorais após a retirada do tratamento, o que pode ser evidenciado pela obtenção de valores de razão de RPR inferiores a 1, comparando-se células tumorais e não tumorais em relação ao CTRL e BORÁ (Figura 24, Tabela 6). Já em relação à comparação com 5-FU (1 μ M), pode-se verificar que células L929 apresentaram velocidade de proliferação semelhante à de células MDA-MB-231, justificando a obtenção de um valor de razão de RPR muito próximo a 1 (Figura 24, Tabela 6). Por fim, os resultados obtidos após o tratamento das células com a associação 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL), mostraram que células MDA-MB-231 apresentaram menor velocidade de proliferação do que células L929, justificando a obtenção de um valor de razão de RPR

superior a 1, comparando-se células tumorais e não tumorais aos três controles (Figura 24, Tabela 6).

Dessa forma, sugere-se que a seletividade de efeito a longo prazo (Figuras 22, 23 e 24) evidenciada neste ensaio não está relacionada apenas a capacidade de as células restaurarem ou não sua taxa de proliferação, mas deve-se principalmente a magnitude do efeito citotóxico inicialmente induzido, o qual foi significativamente superior na linhagem tumoral, em comparação a não tumoral (Figura 9).

Ainda, associando-se todos os resultados do CPD, pode-se verificar que o melhor tratamento a longo prazo foi o realizado com a associação 5-FU ($1\mu\text{M}$) + BORÁ ($22,51\mu\text{g/mL}$), o qual deve ser estendido apenas até o 24º dia, uma vez que observa-se nesse intervalo de tempo, melhor seletividade do tratamento, o que pode ser evidenciado pela maior redução da AUC, do RendCPD, do RPR e do RTCT quando compara-se células tumorais a não tumorais.

Por fim, é pertinente relatar que até o presente momento, não foi observada a realização de CPD com outros própolis, sejam estes aplicados isoladamente ou em associação a quimioterápicos, inviabilizando a comparação dos resultados obtidos com BORÁ e associações, ao efeito promovido por outros própolis e combinações.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- O extrato etanólico do própolis Borá apresentou citotoxicidade significativa nas linhagens tumorais avaliadas, sendo a linhagem MDA-MB-231 a mais susceptível;

- O extrato do própolis Borá induziu maior efeito citotóxico na linhagem tumoral, sendo a linhagem não tumoral L929 a menos susceptível;

- O *screening* pelo método do MTT revelou que a associação mais efetiva foi aquela em que células MDA-MB-231 e L929 foram pré-tratadas com o extrato de Borá e posteriormente tratadas com o quimioterápico 5-fluorouracil;

- A associação extrato de BORÁ + 5-FU induz a morte de células MDA-MB-231 por meio de mecanismos que envolvem a ruptura/desorganização da membrana como morte acidental, apoptose tardia, necroptose ou parthanatos;

- Sugere-se que a associação BORÁ + 5-FU apresenta potencial antimetastático, uma vez que é capaz de retardar a migração de células MDA-MB-231;

- O *screening* pelo ensaio clonogênico revelou que as associações 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) e 5-FU (2 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) foram efetivas a longo prazo;

- O ensaio do CPD evidenciou que a combinação 5-FU (1 μ M) + BORÁ (22,51 μ g/mL) foi o tratamento mais eficaz a longo prazo, devendo este ser estendido apenas até o 24^o dia após o tratamento, por ter apresentado neste intervalo de tempo efeito seletivo na linhagem tumoral, bem como ter restaurado parcialmente a taxa de proliferação de células MDA-MB-231, o que culminou em menor expansão celular.

7. PERSPECTIVAS

Apesar desse trabalho ter investigado o potencial citotóxico do extrato etanólico do própolis de Borá e sua associação com o 5-fluorouracil, há a necessidade de se melhor caracterizar os mecanismos com que Borá sensibiliza as células tumorais a ação deste fármaco. Para isso, sugere-se:

- Caracterizar quimicamente o extrato etanólico do própolis Borá, com o intuito de elucidar possíveis compostos responsáveis pelo efeito citotóxico observado;
- Verificar o potencial efeito anti-invasivo, bem como a fragmentação do DNA induzida pelo extrato de Borá e sua associação a 5-FU;
- Avaliar marcadores específicos dos possíveis mecanismos de morte celular para melhor caracterizar o tipo de morte causada pelo Borá e sua associação a 5-FU;
- Realizar o ensaio clonogênico nos 24° e 30° dias após o tratamento com extrato de Borá e sua associação a 5-FU, para corroborar os resultados obtidos por meio do CPD;
- Analisar o efeito do extrato de Borá e sua associação a 5-FU sobre vias de sinalização envolvidas na sobrevivência, proliferação e progressão tumoral tais como AKT-mTOR, MAPK e Wnt/ β -catenina.

8. REFERENCIAS

ADAMS, K. W.; COOPER, G. M. Rapid turnover of Mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 9, p. 6192–6200, 2007. Elsevier.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; BARRETT REINA, L. D. C.; *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005. Sociedade Brasileira de Química.

AMALIA, E.; DIANTINI, A.; SUBARNAS, A. Water-soluble propolis and bee pollen of *Trigona* spp. from South Sulawesi Indonesia induce apoptosis in the human breast cancer MCF-7 cell line. **Oncology Letters**, v. 20, n. 5, p. 1–1, 2020.

American Cancer Society - Cancer Facts & Figures. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/2022-cancer-facts-and-figures.pdf>>. Acesso em: 19/2/2022.

ANAZETTI, M.; MELO, P. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. n. 1, p. 37–58.

ARU, B.; GÜZELMERIC, E.; AKGÜL, A.; DEMIREL, G. Y.; KIRMIZIBEKMEZ, H. Antiproliferative activity of chemically characterized propolis from Turkey and its mechanisms of action. **Chemistry and Biodiversity**, v. 16, n. 7, 2019. Wiley-VCH Verlag.

ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Tumour progression and metastasis. **Cancer Medical Science**, v. 10, 2016. Global Foundation.

ASGHARPOUR, F.; MOGHADAMNIA, A. A.; MOTALLEBNEJAD, M.; NOURI, H. R. Propolis attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through intracellular ROS and NO levels along with downregulation of IL-1 β and IL-6 expressions in murine RAW 264.7 macrophages. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. e12926, 2019. John Wiley & Sons, Ltd.

BACHEVSKI, D.; DAMEVSKA, K.; SIMEONOVSKI, V.; DIMOVA, M. Back to the basics: propolis and COVID-19. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 4, p. e13780, 2020. John Wiley & Sons, Ltd.

BADISA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; *et al.* Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma mcf-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993–2996, 2009. International Institute of Anticancer Research.

BARBOSA, I. R.; COSTA, I. DO C. C.; PÉREZ, M. M.; SOUZA, D. L. B. Mortalidade por câncer de mama nos estados do nordeste do brasil: tendências atuais e projeções até 2030. **Revista Ciência Plural**, v. 1, n. 1, 2015.

BARTMAŃSKA, A.; TRONINA, T.; POPŁOŃSKI, J.; *et al.* Highly cancer selective antiproliferative activity

of natural prenylated flavonoids. **Molecules** **2018**, v. 23, n. 11, p. 2922, 2018. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

BARTOLOMEU, A. R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; DA SILVA, L. M.; *et al.* Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48–55, 2016. Elsevier Masson SAS.

BAYRAM, N.; KARADAYI, M.; GÜLLÜCE, M.; *et al.* Genotoxic and Antigenotoxic Evaluation of Propolis by Using in Vitro Bacterial Assay Systems. **Mellifera**, v. 15, n. 1, p. 29–36, 2015.

BEAUREGARD, A. P.; HARQUAIL, J.; LASSALLE-CLAUX, G.; *et al.* CAPE analogs induce growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. **Molecules** **2015**, v. 20, n. 7, p. 12576–12589, 2015. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

BEGNINI, K. R.; MOURA DE LEON, P. M.; THUROW, H.; *et al.* Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. 2014.

BENDERLI CIHAN, Y.; DENIZ, K. Effect of propolis against radiation-induced oral mucositis in rats. **Kulak Burun Bogaz Ihtisas Dergisi : KBB = Journal of Ear, Nose, and Throat**, v. 21, n. 1, p. 32–41, 2011.

BENGUEDOUAR L., K.; H.N., B.; H., R.; M, L. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. p. 201–209, 2008.

BENKOVIC, V.; HORVAT KNEZEVIC, A.; DIKIC, D.; *et al.* Radioprotective effects of propolis and quercetin in γ -irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 851–858, 2008. Urban & Fischer.

BEZERRA, L. A.; CAMPBELL, A. J.; BRITO, T. F.; MENEZES, C.; MAUÉS, M. M. Pollen loads of flower visitors to açai palm (*Euterpe oleracea*) and implications for management of pollination services. **Neotropical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 482–490, 2020. Springer.

BOLAND, C. R.; GOEL, A. Somatic evolution of cancer cells. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 6, p. 436–450, 2005. Academic Press.

BONAMIGO, T.; CAMPOS, J. F.; ALFREDO, T. M.; *et al.* Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017. Hindawi Limited.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010. Sociedade Brasileira de Química.

BRENES, O.; ARCE, F.; GÄTJENS-BONICHE, O.; DÍAZ, C. Characterization of cell death events induced

by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 6, p. 347–355, 2007. Elsevier Masson.

BROWN, M. D.; FEAIRHELLER, D. L.; THAKKAR, S.; VEERABHADRAPPA, P.; PARK, J. Y. Racial differences in tumor necrosis factor- α -induced endothelial microparticles and interleukin-6 production. **Vascular Health and Risk Management**, v. 7, n. 1, p. 541, 2011. Dove Press.

BÜRCK, R. R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 2, p. 369–372, 1973. Proceedings of the National Academy of Sciences.

BURNEY, I. A.; AL-MOUNDHRI, M. S. Major Advances in the Treatment of Cancer: What does a Non-Oncologist need to know? **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 8, n. 2, p. 137, 2008. Sultan Qaboos University.

BURSTEIN, H. J.; POLYAK, K.; WONG, J. S.; LESTER, S. C.; KAE LIN, C. M. Ductal Carcinoma *in Situ* of the Breast. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1430–1441, 2004. Massachusetts Medical Society .

CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, H. F.; BONAMIGO, T.; *et al.* Stingless bee propolis: new insights for anticancer drugs. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021. Hindawi Limited.

CAMPOS, J. F.; DAS SANTOS, U. P.; DA ROCHA, P. D. S.; *et al.* Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (jataí). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015. Hindawi Limited.

CAMPOS, J. F.; DOS SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; *et al.* Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 374–380, 2014. Pergamon.

CAO, J.; ZHANG, M.; WANG, B.; *et al.* Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies. **Frontiers in Oncology**, 2021.

CARDOSO, E. DE O. Ação da própolis associada ao docetaxel sobre células de câncer de mama e sobre monócitos humanos, 2021. UNESP.

CHALA, L. F.; DE BARROS, N. Avaliação das mamas com métodos de imagem. **Radiologia Brasileira**, v. 40, n. 1, p. 4–6, 2007. Publicação do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem.

CHAMOND, R.; AÑÓN, C.; AGUILAR, M.; PASADAS, G. Apoptosis y enfermedad. , v. 14, n. 6, p. 367–374, 1999.

CHAN, G. C. F.; CHEUNG, K. W.; SZE, D. M. Y. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 44, n. 3, p. 262–273, 2013. Springer.

CHANG, H.; WANG, Y.; YIN, X.; LIU, X.; XUAN, H. Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2017.

CHIU, H.-F.; HAN, Y.-C.; SHEN, Y.-C.; et al. Chemopreventive and chemotherapeutic effect of propolis and its constituents: a mini-review. **Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 2, p. 70, 2020. Korean Society of Cancer Prevention.

CHOUDHARI, M. K.; HAGHNAZ, R.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Anticancer activity of Indian stingless bee propolis: an *in vitro* study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013.

CIRQUEIRA, M. B.; AMARAL, M.; MOREIRA, R.; SOARES, L. R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Feminina**, v. 39, n. 10, 2011.

CISILOTTO, J.; SANDJO, L. P.; FAQUETI, L. G.; et al. Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: uncommon presence of piperidinic alkaloids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 502–511, 2018. Elsevier.

COOK, S. J.; STUART, K.; GILLEY, R.; SALE, M. J. Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 24, p. 4177–4195, 2017. John Wiley & Sons, Ltd.

CURTIN, J. F.; COTTER, T. G. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 11, p. 983–992, 2003. Elsevier Inc.

CUZICK, J. Preventive therapy for cancer. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 8, p. e472–e482, 2017. Elsevier.

DANIELSEN, S. A.; EIDE, P. W.; NESBAKKEN, A.; et al. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 1, p. 104–121, 2015. Elsevier.

DELANEY, G.; JACOB, S.; FEATHERSTONE, C.; BARTON, M. The role of radiotherapy in cancer treatment. **Cancer**, v. 104, n. 6, p. 1129–1137, 2005. John Wiley & Sons, Ltd.

DELIRE, B.; STÄRKEL, P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 6, p. 609–623, 2015. John Wiley & Sons, Ltd.

DELMONICO, L.; MOREIRA, A. D. S.; FRANCO, M. F.; et al. CDKN2A (p14ARF/p16INK4a) and ATM promoter methylation in patients with impalpable breast lesions. **Human Pathology**, v. 46, n. 10, p. 1540–1547, 2015. W.B. Saunders.

DESAMERO, M. J.; KAKUTA, S.; TANG, Y.; et al. Tumor-suppressing potential of stingless bee propolis in in vitro and in vivo models of differentiated-type gastric adenocarcinoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. Nature Publishing Group.

DUARTE, R. DA S. Aspectos da biologia destinados à criação de *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) (Apidae, Meliponini). Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo. 2012

EGGERT, Y. B. Descrição morfológica do intestino da abelha *Tetragona clavipes* (Hymenoptera, Apidae). 2016.

EHEMAN, C. R.; SHAW, K. M.; RYERSON, A. B.; et al. The changing incidence of *in situ* and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999–2004. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 6, p. 1763–1769, 2009. American Association for Cancer Research.

EL-SAYED; A ALY, H. A.; MOHAMED MANSOUR, A.; et al. Potential Antidiabetic And Hypolipidemic Effects Of Propolis Extract In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Potential. **Pak. J. Pharm**, v. 22, n. 2, p. 168–174, 2009.

ENGELAND, K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a dream. **Cell Death & Differentiation** 2018 25:1, v. 25, n. 1, p. 114–132, 2017. Nature Publishing Group.

ESFAHANI, K.; ROUDAIA, L.; BUHLAIGA, N.; et al. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. **Current Oncology**, v. 27, n. s2, p. 87–97, 2020. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Basic principles of drug delivery systems – the case of paclitaxel. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 95–130, 2019. Elsevier.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015. John Wiley & Sons, Ltd.

FIDLER, I. J.; KRIPKE, M. L. The challenge of targeting metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 34, n. 4, p. 635–641, 2015. Springer.

FORMA, E.; BRYŚ, M. Anticancer activity of propolis and its compounds. **Nutrients**, v. 13, n. 8, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

FRANCHIN, M.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. G.; et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49–55, 2018. Elsevier Masson.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006. Nature Publishing Group.

FRASER, S. P.; HEMSLEY, F.; DJAMGOZ, M. B. A. Caffeic acid phenethyl ester: Inhibition of metastatic cell behaviours via voltage-gated sodium channel in human breast cancer in vitro. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 71, p. 111–118, 2016. Pergamon.

FRIÓN-HERRERA, Y. Atividade citotóxica de amostras de própolis brasileira e cubana contra células tumorais humanas, 2016. UNESP.

FRIÓN-HERRERA, Y.; DÍAZ-GARCÍA, A.; RUIZ-FUENTES, J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, H.; SFORCIN, J. M. The cytotoxic effects of propolis on breast cancer cells involve PI3K/Akt and ERK1/2 pathways, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species generation. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 5, p. 1081–1089, 2019. Birkhauser Verlag AG.

FROZZA, C. O. DA S.; SILVESTRIN, C. C. G.; GAMBATO, G.; et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.

FULDA, S. The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. v. 14, n. 11, p. 999–1004, 2013. Taylor & Francis.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 171–178, 2006. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation** v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018. Nature Publishing Group.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2011. Nature Publishing Group.

GÉRAUD, C.; KOCH, P. S.; DAMM, F.; SCHLEDZEWSKI, K.; GOERDT, S. The metastatic cycle: metastatic niches and cancer cell dissemination. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 11, p. 1012–1019, 2014. John Wiley & Sons, Ltd.

GEYER, F. C.; MARCHIO, C.; REIS-FILHO, J. S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 77–88, 2009. Taylor and Francis Ltd.

GONG, Y.; FAN, Z.; LUO, G.; et al. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2019. BioMed Central.

GOTTLIEB, R. A. Mitochondria: execution central. **FEBS Letters**, v. 482, n. 1–2, p. 6–12, 2000. Elsevier.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012. Nature Publishing Group.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, 2015. Elsevier.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. American Association for Cancer Research.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000. Elsevier.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Cell.

HECHT, F.; PESSOA, C. F.; GENTILE, L. B.; *et al.* The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4281–4291, 2016. Springer.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature** v. 407, n. 6805, p. 770–776, 2000. Nature Publishing Group.

HERZIG, M.; CHRISTOFORI, G. Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1602, n. 2, p. 97–113, 2002. Elsevier.

HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cancer Research**, v. 59, n. 7, p. 1–13, 1999. Springer, Boston, MA.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 28/10/2021.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 19/2/2022.

KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**, v. 42, p. 63–71, 2016. Elsevier.

KHING, T. M.; CHOI, W. S.; KIM, D. M.; *et al.* The effect of paclitaxel on apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe in AGS cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2021. Nature Publishing Group.

KOBLINSKI, J. E.; KAPLAN-SINGER, B. R.; VANOSDOL, S. J.; *et al.* Endogenous osteonectin/sparc/bm-40 expression inhibits mda-mb-231 breast cancer cell metastasis. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7370–7377, 2005. American Association for Cancer Research.

KOFFLER, S.; MENEZES, C.; MENEZES, P. R.; *et al.* Temporal Variation in Honey Production by the Stingless Bee *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae): Long-Term Management Reveals its Potential as a Commercial Species in Northeastern Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 858–867, 2015. Oxford Academic.

KOLCH, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochemical Journal**, v. 351, n. 2, p. 289–305, 2000. Portland Press.

KREEGER, P. K.; LAUFFENBURGER, D. A. Cancer systems biology: a network modeling perspective. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 2–8, 2010. Oxford Academic.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2008. Nature Publishing Group.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins Patologia Humana**. 9° edição ed. 2013.

KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4672–4679, 2003. American Association of Immunologists.

KUSTIAWAN, P. M.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; PALAGA, T.; *et al.* Molecular mechanism of cardol, isolated from *Trigona incisa* stingless bee propolis, induced apoptosis in the SW620 human colorectal cancer cell line. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2017. BioMed Central Ltd.

KUSTIAWAN, P. M.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; PUTHONG, S.; *et al.* Propolis from the Stingless Bee *Trigona incisa* from East Kalimantan, Indonesia, Induces In Vitro Cytotoxicity and Apoptosis in Cancer Cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 15, p. 6581–6589, 2015. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.

LEAL-ESTEBAN, L. C.; FAJAS, L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165715, 2020. Elsevier.

LEMOS, B. E. M. Metástases na cavidade oral: estudo retrospectivo e análise crítica da literatura, 2016. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.

LIAO, H. F.; CHEN, Y. Y.; LIU, J. J.; *et al.* inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7907–7912, 2003. American Chemical Society .

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 2013. The Company of Biologists.

LIU, BONING; WU, X.; LIU, BIN; *et al.* MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 11, p. 1692–1704, 2012. Elsevier.

LIVINGSTON, D. M.; SHIVDASANI, R. Toward Mechanism-Based Cancer Care. **JAMA**, v. 285, n. 5, p.

588–593, 2001. American Medical Association.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer** **2003** **3:5**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003. Nature Publishing Group.

MACEDO, M.; TOSCANO, M.; NÓBREGA, W.; *et al.* Precauções para linfedema em mulheres acometidas por câncer de mama pós esvaziamento axilar: revisão de escopo. **Revista Enfermagem UERJ**, 2020.

MANSOORI, B.; MOHAMMADI, A.; DAVUDIAN, S.; SHIRJANG, S.; BARADARAN, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339, 2017. Tabriz University of Medical Sciences.

MANSUR, A.; FAVARATO, D. Taxas de Mortalidade por Doenças Cardiovasculares e Câncer na População Brasileira com Idade entre 35 e 74 Anos, 1996–2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, n. 2, p. 329–340, 2021. Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns and Trauma**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2015. Oxford University Press.

MAURILLO, L.; DEL POETA, G.; VENDITTI, A.; *et al.* Quantitative analysis of Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. **Haematologica**, v. 86, n. 3, 2001.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P.; *et al.* Chapter 9 The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. **Methods in Cell Biology**, v. 46, n. C, p. 153–185, 1995. Academic Press.

DE MENDONÇA, I. C. G.; PORTO, I. C. C. DE M.; DO NASCIMENTO, T. G.; *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015. BioMed Central.

MINH, D.; PEREZ-LOSADA, J.; MAO, J. H.; BALMAIN, A. Crosstalk Between Pten and Ras Signaling Pathways in Tumor Development. v. 4, n. 9, p. 1185–1188, 2005. Taylor & Francis.

Ministério da Saude. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer>>. Acesso em: 19/2/2022.

MIRYAN, M.; SOLEIMANI, D.; DEGHANI, L.; *et al.* The effect of propolis supplementation on clinical symptoms in patients with coronavirus (COVID-19): a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**, v. 21, n. 1, p. 1–2, 2020. BioMed Central Ltd.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1439–1453, 2005. Pergamon.

MOHD-YAZID, N. A.; ZIN, N. B.; PAUZI, N.; MOHD, K. S. preliminary evaluation of antioxidant and cytotoxic activity of ethanolic extract of stingless bees propolis from different localities. **Journal Of Agrobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 132–141, 2018.

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. Elsevier.

NEDELJKOVIC, M.; DAMJANOVIC, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. , 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. American Chemical Society.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, 2013.

O'REILLY, D.; SENDI, M. AL; KELLY, C. M. Overview of recent advances in metastatic triple negative breast cancer Conflict-of-interest statement. **World Journal of Clinical Oncology** , v. 12, n. 3, p. 164–182, 2021.

OBENG, S.; HIRANITA, T.; LEÓN, F.; MCMAHON, L. R.; MCCURDY, C. R. Novel Approaches, Drug Candidates, and Targets in Pain Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 10, p. 6523–6548, 2021. American Chemical Society.

DE OLIVEIRA, P.; MOTA DE SOUZA LIMA, I.; MUNARI, C. C.; *et al.* Comparative evaluation of anti-proliferative effects of brazilian green propolis, its main source baccharis dracunculifolia, and their major constituents artepillin c and baccharin, 2014.

OROIAN, M.; URSACHI, F.; DRANCA, F. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, p. 105021, 2020. Elsevier.

ORŠOLIČ, N.; CAR, N.; LISIČIČ, D.; *et al.* synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on ehrlich ascites tumor in mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 12, p. 4395–4405, 2013. John Wiley & Sons, Ltd.

ORŠOLIČ, N.; SKURIĆ, J.; CROSSED D SIGNIKIĆ, D.; STANIĆ, G. inhibitory effect of a propolis on di-n-propyl disulfide or n-hexyl salicylate-induced skin irritation, oxidative stress and inflammatory responses in mice. **Fitoterapia**, v. 93, p. 18–30, 2014. Elsevier.

ORŠOLIČ, N.; TERZIĆ, S.; MIHALJEVIĆ, Ž.; ŠVER, L.; BAŠIĆ, I. effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 10, p. 1928–1933, 2005. The Pharmaceutical Society of Japan.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer** 2017 17:2, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017. Nature Publishing Group.

ÖZKÖK, A.; KESKIN, M.; TANUĞUR SAMANCI, A. E.; YORULMAZ ÖNDER, E.; TAKMA, Ç. Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis. **Applied Biological Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 1–10, 2021. Springer Science and Business Media B.V.

PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; CHODON, D.; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 24, p. 2820–2825, 2006. Pergamon.

PALUMBO, M. O.; KAVAN, P.; MILLER, W. H.; *et al.* Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 57, 2013. Frontiers.

PEREIRA, F. DE C. Mecanismo de morte celular induzida por complexos de rutênio II e III em diferentes linhagens tumorais, 2014. Goiânia: Universidade Federal de Goiás.

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. e12757, 2017. John Wiley & Sons, Ltd.

POLIVKA, J.; JANKU, F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 2, p. 164–175, 2014. Pergamon.

PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 2019. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

QIN, A.; REDDY, H. G.; WEINBERG, F. D.; KALEMKERIAN, G. P. Cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of lung cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, n. 8, p. 941–952, 2020. Taylor & Francis.

QUINTINO, R. L.; REIS, A. C.; FERNANDES, C. C.; *et al.* Brazilian Green Propolis: Chemical Composition of Essential Oil and Their In Vitro Antioxidant, Antibacterial and Antiproliferative Activities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, p. 1–9, 2020. Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar.

ROBERTS, P. J.; DER, C. J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291–3310, 2007. Nature Publishing Group.

RODRIGUES, M.; SANTANA, W. C.; FREITAS, G. S.; SOARES, A. E. E. Flight a activity of *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) at the São Paulo University campus in Ribeirão Preto. **Biosci. j. (Online)**, v. 23, n. 1, p. 118–124, 2007.

ROSKOSKI, R. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. **Pharmacological Research**, v. 139, p. 471–488, 2019. Academic Press.

ROUIBAH, H.; KEBSA, W.; LAHOUEL, M.; *et al.* Algerian propolis potentiates doxorubicin mediated anticancer effect against human pancreatic panc-1 cancer cell line through cell cycle arrest, apoptosis induction and p-glycoprotein inhibition. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 375–387, 2018.

ROUIBAH, H.; KEBSA, W.; LAHOUEL, M.; *et al.* Algerian propolis: between protection of normal cells and potentialisation of the anticancer effects of doxorubicin against breast cancer cells via P-glycoprotein inhibition and cell cycle arrest in the S phase. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 72, n. 2, 2021. NLM (Medline).

ROZPEDEK, W.; PYTEL, D.; MUCHA, B.; LESZCZYNSKA, H. The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. **Current Molecular Medicine**, v. 16, n. 6, p. 533–544, 2016.

SAMENI, H. R.; YOSEFI, S.; ALIPOUR, M.; *et al.* Co-administration of 5-FU and propolis on AOM/DSS induced colorectal cancer in BALB-c mice. **Life Sciences**, v. 276, p. 119390, 2021.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; LALLENA, M. J.; SANFELICIANO, S. G.; DE DIOS, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: recent advances (2015–2019). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 20, p. 126637, 2019. Pergamon.

SANTO, L.; SIU, K. T.; RAJE, N. Targeting cyclin-dependent kinases and cell cycle progression in human cancers. **Seminars in Oncology**, v. 42, n. 6, p. 788–800, 2015. W.B. Saunders.

SANTOS, A. F.; SCHIEFER, E. M.; ATHERINO, M. C.; *et al.* Schiefer counter: An alternative method for clonogenic assay evaluation. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 106, p. 106911, 2020. Elsevier.

SANTOS, C. F. DOS; RAGUSE-QUADROS, M.; RAMOS, J. D.; *et al.* Diversidade de abelhas sem ferrão e seu uso como recurso natural no Brasil: permissões e restrições legais consorciadas a políticas públicas. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, p. 1–21, 2021.

SAVAGNER, P. The epithelial–mesenchymal transition (EMT) phenomenon. **Annals of Oncology**, v. 21, n. SUPPL. 7, p. vii89–vii92, 2010. Elsevier.

SBOC Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica Mama: doença localizada adjuvância. Comitê de tumores mamários 2022a.

SBOC Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica Mama: doença metastáticas. Comitê de tumores mamários 2022b.

SBOC Diretrizes de tratamentos oncológicos recomendados pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica Mama: doença localizada neoadjuvância. Comitê de tumores mamários 2022c.

SCULLY, O. J.; BAY, B.-H.; YIP, G.; YU, Y. Breast cancer metastasis. **Cancer Genomics & Proteomics**,

v. 9, n. 5, p. 311–320, 2012.

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. 36, n. 5, p. 429–455, 2019. Taylor & Francis.

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, 2011. Elsevier.

SFORCIN, J. M.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B. Própolis e geoprópolis: uma herança das abelhas. **Editora Unesp**, v. 1, p. 65–68, 2017.

SILVA, A. O.; FELIPE, K. B.; VILLODRE, E. S.; LOPEZ, P. L. C.; LENZ, G. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumor Biology** 2016 **37:10**, v. 37, n. 10, p. 13743–13749, 2016. Springer.

SILVA NETO, C. DE M. **A IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS PARA A CULTURA DO TOMATEIRO** , 2016. Universidade Federal de Goiás.

SIMPSON, P. T.; GALE, T.; FULFORD, L. G.; REIS-FILHO, J. S.; LAKHANI, S. R. Pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma *in situ*. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 258–262, 2003. BioMed Central.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790–800, 2009. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **WORLD CANCER REPORT 2014** . 2014.

SUREK, M.; FACHI, M. M.; DE FÁTIMA COBRE, A.; et al. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113662, 2021. Elsevier.

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 Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 17, n. 5, p. 553–562, 2002. Mary Ann Liebert Inc.

TANG, D.; KANG, R.; BERGHE, T. VANDEN; VANDENABEELE, P.; KROEMER, G. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Research**, v. 29, n. 5, p. 347–364, 2019. Cell Res.

TANIDA, S.; MIZOSHITA, T.; OZEKI, K.; et al. Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: Potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment. **International Journal of Surgical Oncology**, v, 2012.

TAYMAZ-NIKEREL, H.; KARABEKMEZ, M. E.; ERASLAN, S.; KIRDAR, B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14,

2018. Nature Publishing Group.

UY, G. L.; COSTA, L. J.; HARI, P. N.; et al. Contribution of chemotherapy mobilization to disease control in multiple myeloma treated with autologous hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 50, n. 12, p. 1513–1518, 2015. Nature Publishing Group.

VILLAS-BÔAS, J. Manual tecnológico: mel de abelhas sem ferrão. **Abong**, 2012. Instituto Sociedade, População e Natureza.

VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E.; et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 340, n. 6127, p. 1546–1558, 2013. American Association for the Advancement of Science.

WADHWA, R.; NIGAM, N.; BHARGAVA, P.; et al. Molecular characterization and enhancement of anticancer activity of caffeic acid phenethyl ester by γ cyclodextrin. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 13, p. 1755–1771, 2016. Ivyspring International Publisher.

WANG, H. X.; TANG, C. Galangin suppresses human laryngeal carcinoma via modulation of caspase-3 and AKT signaling pathways. **Oncology Reports**, v. 38, n. 2, p. 703–714, 2017. Spandidos Publications.

WANG, H.; XIANG, D.; LIU, B.; et al. Inadequate DNA Damage Repair Promotes Mammary Transdifferentiation, Leading to BRCA1 Breast Cancer. **Cell**, v. 178, n. 1, p. 135–151.e19, 2019. Cell Press.

WATANABE, M. A. E.; AMARANTE, M. K.; CONTI, B. J.; SFORCIN, J. M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378–1386, 2011. Oxford Academic.

WEBER, G. F. Why does cancer therapy lack effective anti-metastasis drugs? **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 207–211, 2013. Elsevier.

WEIS, W. A.; RIPARI, N.; CONTE, F. L.; et al. An overview about apitherapy and its clinical applications. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 2, p. 100239, 2022. Elsevier.

WHO | World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acesso em: 19/2/2022.

WOLFGRAMM, E.; BIANCARDI GAVIOLI, C. F.; ENTRINGER, M. L.; et al. Histological profile and age at diagnosis of breast and ovarian tumors: A register-based study in Espirito Santo, Brazil. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 1, n. 2, p. 353–358, 2013. Spandidos Publications.

WU, J.; OMENE, C.; KARKOSZKA, J.; et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. **Cancer Letters**, v. 308, n. 1, p. 43–53, 2011. Elsevier.

YAN, S.; TANG, Z.; CHEN, K.; et al. Long noncoding RNA MIR31HG inhibits hepatocellular carcinoma

proliferation and metastasis by sponging microRNA-575 to modulate ST7L expression. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–16, 2018. BioMed Central Ltd.

ZABAIYOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; *et al.* Biological properties of propolis extracts: something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, 2017. Elsevier.

ZACCARIA, V.; CURTI, V.; DI LORENZO, A.; *et al.* Effect of green and brown propolis extracts on the expression levels of microRNAs, mRNAs and proteins, related to oxidative stress and inflammation. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1090, 2017. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

ZHU, L.; CHEN, L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 24, n. 1, p. 1–11, 2019. Springer International Publishing.

ZINGUE, S.; MAXEINER, S.; RUTZ, J.; *et al.* Ethanol-extracted cameroonian propolis: antiproliferative effects and potential mechanism of action in prostate cancer. **Andrologia**, v. 52, n. 9, p. e13698, 2020. John Wiley & Sons, Ltd.