

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

**EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTICÂNCER DE GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS
SEM FERRÃO DO CERRADO BRASILEIRO**

HELDER FREITAS DOS SANTOS

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2023

HELDER FREITAS DOS SANTOS

**EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTICÂNCER DE GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS
SEM FERRÃO DO CERRADO BRASILEIRO**

Tese apresentada a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Dourados
Mato Grosso do Sul – BRASIL
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237e Santos, Helder Freitas Dos
EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTICÂNCER DE GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS SEM
FERRÃO DO CERRADO BRASILEIRO [recurso eletrônico] / Helder Freitas Dos Santos. --
2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Edson Lucas dos Santos.
Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande
Dourados, 2023.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Produto apícola. 2. Bioprospecção. 3. Produto biotecnológico. 4. Estresse oxidativo.
5. Câncer. I. Santos, Edson Lucas Dos. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**“EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTICÂNCER DE GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS
SEM FERRÃO DO CERRADO BRASILEIRO”**

POR

HELDER FREITAS DOS SANTOS

**TESE APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
(UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE - ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO: “BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE”.**



**PROF. DR. EDSON LUCAS DOS SANTOS
ORIENTADOR – UFGD**



**PROF.ª DR.ª KELY DE PICOLI SOUZA
MEMBRO TITULAR – UFGD**



**PROF.ª DR.ª DEBORA DA SILVA BALDIVIA
MEMBRO TITULAR – UFGD**



**PROF. DR. UILSON PEREIRA DOS SANTOS
MEMBRO TITULAR – SES/MS**



**PROF.ª DR.ª DENISE BRENTAN DA SILVA
MEMBRO TITULAR – UFMS**

Aprovado em 22 de setembro de 2023.

DEDICATÓRIA

*Com profundo amor, dedico esta tese a minha avó materna **Onília de Oliveira Martins** (in memorian). Saudade do seu sorriso, simplicidade e bondade. Embora tenha partido, você permanecerá eternamente viva em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me dar forças e atender aos meus pedidos. Em meio aos desafios e dias difíceis, tenho sentido sua presença e apoio de maneira inabalável. Obrigado por iluminar minha vida com esperança, fé e amor. Com Você ao meu lado, sempre irei superar qualquer desafio que a vida me apresentar. Oro para que sua presença continue me guiando, me abençoando e me ajudando a tomar as decisões certas, não apenas em dias difíceis, mas em cada passo da minha vida.

Aos meus pais, Paulo dos Santos e Cleidimar Freitas Martins dos Santos, pelo amor incondicional, pela educação, pela base familiar que me proporcionaram, pela oportunidade de estudar e terem contribuído com meus sonhos. Amo vocês! A minha irmã Helen Cristina dos Santos, pelos momentos de preocupação, carinho e descontração.

À minha amada namorada e parceira de vida Edith Palácio, pelo grande exemplo de companheirismo, por me apoiar e me incentivar, pela paciência e ajuda nos momentos difíceis, compreensão, conselhos, carinho e amor.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos, por acreditar e confiar em mim, por me dar a oportunidade de aprender cada dia mais e por contribuir imensamente para minha formação profissional e pessoal. Agradeço por ter mencionado sobre a geoprópolis durante o início de minha iniciação científica e ter seguido me orientando e transmitindo valiosos ensinamentos até hoje! Ao senhor, meus sinceros agradecimentos, consideração e respeito.

Agradecimentos especiais a Profa. Dra. Kely de Picoli Souza, pela confiança, por acreditar em mim, por todos os ensinamentos que aprendi durante todos estes anos, por me motivar e contribuir grandemente para a minha formação profissional e pessoal. Agradeço por me orientar em diversos momentos, por inspirar e me ajudar a seguir meus objetivos. À senhora, meus agradecimentos, respeito e consideração.

Ao Prof. Dr. José Benedito Perrella Balestieri, pelos conhecimentos transmitidos sobre as espécies de abelhas sem ferrão e por fornecer as amostras de geoprópolis.

Ao Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira, pelos ensinamentos transmitidos, orientação, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e pela oportunidade de parceria e pelos momentos de descontração durante meu período de doutorado.

Agradeço ao meu amigo David Castro, pelas conversas, discussões científicas, pela colaboração na realização de experimentos e momentos de aprendizado e descontração. Lembrarei sempre dos ensaios muitas vezes realizados no meio da noite e madrugada, e dos momentos de parceria.

Agradeço ao meu amigo Daniel, por estar sempre disposto a ajudar, pelo companheirismo, pelo auxílio na realização de experimentos, momentos de descontração e discussões científicas.

Aos professores doutores que aceitaram compor a banca avaliadora desta defesa de tese de doutorado, Denise Brentan da Silva, Débora Baldivia da Silva, Paola dos Santos da Rocha, Uilson Pereira dos Santos, Kely de Picoli Souza e Edson Lucas dos Santos. Obrigado pela disponibilidade e dedicação em participar deste momento tão importante. Minha enorme gratidão pelas contribuições na correção deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, e a Universidade Federal da Grande Dourados, nas quais realizei este trabalho de doutorado.

A todos os membros do GEBBAM (Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo), por ser praticamente minha segunda casa durante estes quase 11 anos! Obrigado pelo companheirismo e momentos de descontração e ensinamentos, sejam em dias corriqueiros no laboratório e/ou durante discussões e avaliações do grupo.

À Capes, CNPq, Fundect e Finep por fomentar a realização desta pesquisa.

A todos aqueles que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste estudo:

Muito obrigado!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das espécies reativas de nitrogênio e seus exemplos de espécies radicalares e não radicalares.....	4
Figura 2 – Classificação das espécies reativas de oxigênio e seus exemplos de espécies radicalares e não radicalares.....	4
Figura 3 – Fontes de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS: <i>Reactive oxygen species</i>) presentes na célula.....	5
Figura 4 – Atuação de mecanismos antioxidantes enzimáticos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio.....	8
Figura 5 – Fatores exógenos de ERO e seus efeitos sobre a saúde humana por meio de danos a macromoléculas.....	13
Figura 6 – Número de óbitos no mundo, promovidos por diferentes causas no ano de 2019.....	18
Figura 7 – Estimativa de casos de câncer e mortes em todo mundo, no ano de 2018. (Exceto câncer de pele não-melanoma).....	18
Figura 8 – <i>Hallmarks of cancer</i> (marcas registradas do câncer).....	20
Figura 9 – Representação esquemática dos eventos da formação de um tumor primário e sua interdependência com os estágios do processo carcinogênico.....	21
Figura 10 – Visão global da cascata metastática.....	23
Figura 11 – Representação esquemática da transição epitélio-mesenquimal.....	24
Figura 12 – Representação esquemática dos mecanismos que podem contribuir para a entrada de células cancerígenas na vasculatura (intravasão).....	25
Figura 13 – Desregulação da via de sinalização MAPK no melanoma.....	29
Figura 14 – Os critérios ABCDE do melanoma.....	30
Figura 15 – Produção de células sanguíneas a partir da diferenciação de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea.....	31
Figura 16 – Formação do cromossomo Filadélfia.....	34
Figura 17 – Representação esquemática da morte celular programada (apoptose) e suas vias extrínseca e intrínseca.....	39

Figura 18 – Representação esquemática das vias envolvidas no mecanismo de morte celular por necroptose.....	43
Figura 19 – Fármacos anticâncer aprovados entre 1949 – 30/09/2019.....	46
Figura 20 – Amostras de geoprópolis coletadas no estado de Mato Grosso do Sul. Amostras produzidas pelas espécies de abelhas sem ferrão (A) <i>Melipona orbignyi</i> e (B) <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	53
Figura 21 – Quantidade de estudos para cada uma das atividades biológicas evidenciadas em geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão.....	54
Figura 22 – Relação da quantidade de estudos realizados sobre as atividades biológicas e caracterização química da geoprópolis das abelhas sem ferrão no mundo.....	58
Figura 23 – Quantidade de estudos realizados utilizando amostras de geoprópolis de diferentes estados do Brasil.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo para homens e mulheres para o ano de 2023.....	19
Tabela 2 – Compostos de produtos naturais analisados frente a redução de efeitos adversos da quimioterapia.....	48
Tabela 3 – Efeitos adjuvantes e citotóxicos de extratos ou compostos de produtos naturais frente a diferentes tipos de câncer.....	49
Tabela 4 – Constituintes químicos, atividades biológicas e efeitos terapêuticos/mecanismos de ação relatados sobre geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão.....	55
Tabela 5 – Composição mineral de macro e microelementos evidenciados em geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

•OH – Radical hidroxila

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

4-HNE – 4-hidroxinonenal

AAPH – 2,2'-Azobis (2- amidinopropano) dicloridrato

AGP – Ácido graxo poli-insaturado

BSA – Albumina sérica bovina

C. elegans – *Caenorhabditis elegans*

CAT – Catalase

CTC's – Células tumorais circundantes

CTD's – Células tumorais disseminadas

Cu – Cobre

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EC – Extracelular

EGMO – Extrato hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona orbignyi*

EGMQ – Extrato hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ERS – Espécies reativas de enxofre

FasL – Fas Ligante

Fe^{2+} – Íon ferroso

Fe^{3+} – Íon férrico

GPx – Glutathiona peroxidase

GRd – Glutathione redutase

GSH – Glutathione reduzida

GSSH – Glutathione oxidada

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico

HO₂[•] – Radical hidroperoxila

HOCl – Ácido hipocloroso

HPV – Papilomavírus humano

HSA – Albumina sérica humana

HTLV-1 – Vírus linfotrópico de células-T humanas

Juglone – 5-hidroxil-1,4-naftoquinona

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LLC – Leucemia Linfóide Crônica

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

M. orbignyi – *Melipona orbignyi*

M. q. anthidioides – *Melipona quadrifasciata anthidioides*

MDA – Malondialdeído

Mn – Manganês

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NO[•] – Radical óxido nítrico

NO₂[•] – Radical dióxido de nitrogênio

O₂^{•-} – Radical ânion superóxido

O₃ – Ozônio

ONOO⁻ – Peroxinitrito

ONOOH – Ácido peroxinitroso

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão fosfato-salino

PRx – Peroxirredoxina

RO• – Radical alcóxila

ROO• – Radical peróxila

RPMI 1640 – *Roswell Park Memorial Institute*

SFB – Soro fetal bovino

SOD – Superóxido dismutase

TNFR-1 – Receptor 1 de TNF

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TRAIL – TNF-ligante indutor relacionado a apoptose

Txr – Tiorredoxina

TxrR – Tiorredoxina redutase

Zn – Zinco

SANTOS, Helder Freitas Dos, Dr. Universidade Federal da Grande Dourados, setembro de 2023. **EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTICÂNCER DE GEOPRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO DO CERRADO BRASILEIRO.** Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

RESUMO

Utilizados há milênios, os produtos naturais têm sido essenciais no tratamento de inúmeras doenças e são considerados uma fonte inestimável de substâncias bioativas com propriedades farmacológicas. Dentre estas substâncias, destacam-se as com ação antioxidante, capaz de prevenir doenças associadas ao estresse oxidativo, incluindo o câncer. Além da prevenção, os produtos naturais são investigados frente ao seu potencial antineoplásico, com intuito de desenvolver fármacos mais eficientes e/ou com efeitos adversos reduzidos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis produzidas pelas abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* (EGMO) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ) frente a danos oxidativos *in vitro* e *in vivo* e avaliar seu efeito em diferentes linhagens de câncer. O efeito contra danos oxidativos *in vitro* foi avaliado em proteínas e DNA. Para investigação dos efeitos *in vivo* sobre estresse oxidativo, térmico e longevidade foi utilizado o modelo *Caenorhabditis elegans*. Os efeitos do EGMO e EGMQ foram investigados em células de rabdomiossarcoma, carcinoma pulmonar, melanoma e leucemia, utilizando o ensaio de viabilidade celular MTT. A inibição da migração celular das linhagens de células de melanoma foi avaliada pelo ensaio de ranhura. Os mecanismos de morte foram investigados utilizando citometria de fluxo e através do uso de inibidores farmacológicos. Os resultados mostram que o EGMO e EGMQ promoveram a redução da oxidação de proteínas e fragmentação do DNA. Os extratos não foram tóxicos no modelo *in vivo* e promoveram proteção contra o estresse oxidativo induzido por juglone e contra o estresse térmico em *C. elegans*. Além disso, o EGMO e o EGMQ aumentaram a expectativa de vida dos nematoides, de maneira dose-dependente. Em relação ao efeito anticâncer, ambos os extratos promoveram de modo seletivo, citotoxicidade em todas as linhagens cancerígenas avaliadas. O EGMO e EGMQ também promoveram efeito inibitório sobre a migração celular de todas as linhagens de células de melanoma. A citotoxicidade promovida pelo EGMO/EGMQ nas células de melanoma murino B16F10-Nex2 e de leucemia Jurkat foi induzida predominantemente via apoptose dependente de caspases e em seguida por necroptose através da ativação de RIPK-1. Nas células K562, os extratos de geoprópolis promoveram ação citotóxica via indução de apoptose dependente de caspases. Em conjunto, estes resultados demonstram que os extratos de geoprópolis de *M. orbignyi* e *M.q. anthidioides* possuem propriedades biológicas com potencial aplicação terapêutica na prevenção e tratamento de doenças desencadeadas pelo estresse oxidativo e/ou proliferação de células cancerosas.

Palavras-chave: Produto apícola, Bioprospecção, Produto biotecnológico, Estresse oxidativo, Câncer

SANTOS, Helder Freitas Dos, Dr. Federal University of Grande Dourados, september 2023. **ANTIOXIDANT AND ANTICANCER EFFECTS OF GEOPROPOLIS FROM STINGLESS BEES FROM THE BRAZILIAN CERRADO**. Advisor: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

ABSTRACT

Used for millennia, natural products have been essential in the treatment of numerous diseases and are considered an invaluable source of bioactive substances with pharmacological properties. Among these substances, those with antioxidant action stand out, capable of preventing diseases associated with oxidative stress, including cancer. In addition to prevention, natural products are investigated for their antineoplastic potential, with the aim of developing more efficient drugs and/or with reduced adverse effects. In this context, the objective of this study was to investigate the effect of hydroethanolic extracts of geopropolis produced by the stingless bees *Melipona orbignyi* (EGMO) and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ) against oxidative damage in vitro and in vivo and to evaluate their effect on different cancer cell lines. The effect against oxidative damage in vitro was evaluated in proteins and DNA. To investigate the in vivo effects on oxidative and thermal stress and longevity, the *Caenorhabditis elegans* model was used. The effects of EGMO and EGMQ were investigated in rhabdomyosarcoma, lung carcinoma, melanoma and leukemia cells using the MTT cell viability assay. The inhibition of cell migration of melanoma cell lines was evaluated by the scratch assay. The mechanisms of death were investigated using flow cytometry and through the use of pharmacological inhibitors. The results show that EGMO and EGMQ promoted the reduction of protein oxidation and DNA fragmentation. The extracts were non-toxic in the in vivo model and promoted protection against juglone-induced oxidative stress and against heat stress in *C. elegans*. Furthermore, EGMO and EGMQ increased the life expectancy of nematodes in a dose-dependent manner. Regarding the anticancer effect, both extracts promoted selective cytotoxicity in all cancer cell lines evaluated. EGMO and EGMQ also promoted an inhibitory effect on cell migration of all melanoma cell lines. The cytotoxicity promoted by EGMO/EGMQ in B16F10-Nex2 murine melanoma and Jurkat leukemia cells was induced predominantly via caspase-dependent apoptosis and then by necroptosis through RIPK-1 activation. In K562 cells, geopropolis extracts promoted cytotoxic action via induction of caspase-dependent apoptosis. Together, these results demonstrate that geopropolis extracts from *M. orbignyi* and *M.q. anthidioides* have biological properties with potential therapeutic application in the prevention and treatment of diseases triggered by oxidative stress and/or cancer cell proliferation.

Keywords: Bee Product, Bioprospection, Biotechnologic product, Oxidative stress, Cancer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Espécies reativas e radicais livres.....	3
2.2. Defesas antioxidantes.....	7
2.2.1. Antioxidantes endógenos enzimáticos.....	7
2.2.2. Antioxidantes endógenos não enzimáticos.....	9
2.2.3. Antioxidantes exógenos.....	11
2.3. Estresse oxidativo.....	12
2.4. Câncer.....	17
2.4.1. O Processo carcinogênico.....	19
2.4.2. Metástases.....	22
2.5. Câncer de pele: não-melanoma e melanoma.....	27
2.6. Leucemias.....	31
2.7. Tratamentos oncológicos.....	35
2.7.1. Quimioterápicos: Mecanismos de ação e obstáculos....	37
2.8. Produtos Naturais.....	45
2.9. Abelhas sem ferrão e produtos apícolas.....	50
2.9.1. A geoprópolis das abelhas sem ferrão.....	52
3. OBJETIVOS.....	60
3.1. Objetivo geral.....	60
3.2. Objetivos específicos.....	60
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
5. APÊNDICES.....	90
5.1. Artigos científicos.....	90
5.1.1. Artigo 1: Efeito protetor de Geoprópolis de <i>Melipona orbignyi</i> e <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> contra estresse oxidativo e aumento da expectativa de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	91
5.1.2. Artigo 2: Geoprópolis de abelhas sem ferrão inibem a migração celular e induzem a morte de células cancerosas via apoptose e necroptose.....	113
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	146

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país detentor de 10 a 20% de todas as espécies vivas conhecidas do mundo e destaque como uma das nações com maior biodiversidade (Pílon *et al.*, 2017; Magnusson *et al.*, 2018). O País aporta diferentes biomas, tais como a Amazônia, Pantanal, Pampa, Caatinga e além destes a Mata Atlântica e Cerrado, que são considerados *hotspots* de biodiversidade global (Vacchiano *et al.*, 2019).

Localizado no centro do Brasil, o Cerrado é considerado o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de mais de 2.036.448 de km² (Ministério do meio Ambiente, MMA, 2024a; Ribeiro *et al.*, 2020). Considerado como a savana tropical mais rica do mundo, o Cerrado possui 5% de toda a biodiversidade do planeta (EMBRAPA, 2021), incluindo mais de 4.800 espécies endêmicas de plantas e vertebrados (Strassburg *et al.*, 2017). Além disso, detêm 30% de toda a biodiversidade nacional (Françoso *et al.*, 2015).

Apesar do Cerrado abrigar imensos níveis de biodiversidade, somente uma pequena parcela de seus recursos naturais é alvo de estudos científicos e desenvolvimento de produtos para fins comerciais. Como alternativa, a bioprospecção revela-se como a busca sistemática de recursos na biodiversidade, para obtenção de produtos comercialmente valiosos e geração de valor social e econômico (Sawarkar *et al.*, 2019; Dwivedy, 2020).

A bioprospecção é desenvolvida em diversos setores, incluindo nutrição (Matos *et al.*, 2019), cosmética (Mendes-Silva *et al.*, 2020), ambiental (Purohit *et al.*, 2018), bioenergia (Guil-layne *et al.*, 2019), biotecnologia (Delgado-García *et al.*, 2019) e saúde (Menezes *et al.*, 2020). Atualmente, a biodiversidade do Cerrado tem atraído a atenção de pesquisadores que buscam princípios ativos promissores para a saúde humana advindos de produtos naturais. Plantas medicinais e os produtos apícolas, vêm sendo investigados, e diversas propriedades terapêuticas têm sido relatadas (Campos *et al.*, 2014, Campos *et al.*, 2015; Bonamigo *et al.*, 2017; Baldivia *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2019).

Dentre os produtos apícolas, a geoprópolis, também conhecida como batume (Nogueira-Neto, 1997), é uma mistura de resinas vegetais, secreções mandibulares de abelhas, pólen, cera e terra (Cunha *et al.*, 2013a; Dutra *et al.*, 2019). Este recurso natural é produzido exclusivamente por espécies de abelhas nativas sem ferrão do gênero *Melipona*, encontradas em regiões tropicais e subtropicais (Dutra *et al.*, 2014;

Oliveira *et al.*, 2019). Na colmeia, este material é utilizado na vedação de frestas e para estruturar partes internas e a entrada de seus ninhos (Nogueira-Neto, 1997; Ferreira *et al.*, 2017).

Utilizado na medicina popular como agente antisséptico e imunestimulante (Bartolomeu *et al.*, 2016), a geoprópolis também tem sido utilizada no Brasil por indígenas do estado do Maranhão e da região amazônica, no tratamento de doenças cutâneas, respiratórias, pulmonares e infecções oculares (Souza *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2016). Na literatura científica, diversas propriedades biológicas de geoprópolis produzidas por diferentes espécies de abelhas sem ferrão foram evidenciadas, tais como as ações antimicrobiana (Cunha *et al.*, 2020), antiviral (Coelho *et al.*, 2015), antileishmaniose (Dutra *et al.*, 2019), gastroprotetora (Ribeiro-Junior *et al.*, 2015), imunomodulatória (Oliveira *et al.*, 2016), anti-inflamatória, antimutagênica, antioxidante (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b) e anticâncer (Cinegaglia *et al.*, 2013; Bartolomeu *et al.*, 2016; Barboza *et al.*, 2020).

O amplo espectro de propriedades terapêuticas deste produto natural tem sido associado à sua grande diversidade de componentes químicos. Tais como, saponinas (Dutra *et al.*, 2008), ácidos gálico e elágico (Dutra *et al.*, 2019), fenilpropanóides, taninos hidrolisáveis (Souza *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014), flavononóis, flavononas, flavonas, chalconas (Sousa-Fontoura *et al.*, 2020), alcalóides (Coelho *et al.*, 2015), estirenos, benzaldeídos (Torres-Gonzalez *et al.*, 2015), triterpenos, (Barboza *et al.*, 2020) e sesquiterpenos (Santos *et al.*, 2017a), que foram evidenciados em geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão.

A geoprópolis é uma importante fonte de compostos bioativos (Dutra *et al.*, 2014) e apresenta potencial biológico promissor. Contudo, na literatura poucos estudos sobre este produto são encontrados. Através de uma busca realizada utilizando o termo “geopropolis” em 07 de setembro de 2023, no banco de dados Pubmed, da plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information), apenas 42 estudos foram encontrados.

Dentre estes, as geoprópolis produzidas pelas espécies *Melipona orbignyi* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresentam as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana, além da presença de ácidos fenólicos glicosilados, flavonoides e terpenos. Entretanto, estudos que avaliem seu potencial antioxidante em macromoléculas e sobre modelos *in vivo* são inexistentes.

Adicionalmente, em relação ao potencial anticâncer, a geoprópolis de *M. orbignyi* ainda não foi investigada e os estudos sobre a geoprópolis de *M.q. anthidioides* são escassos.

Neste contexto, propomos investigar o efeito protetor dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis produzidos pelas espécies de abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* (EGMO) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ) contra danos oxidativos em proteínas e DNA *in vitro* e em modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* sob estresse oxidativo, bem como avaliar seu efeito e mecanismos anticâncer em diferentes linhagens cancerígenas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espécies reativas e radicais livres

Espécies reativas é um termo utilizado para classificar uma variedade de moléculas derivadas do oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN) e enxofre (ERS) produzidas durante processos metabólicos. Dentre as espécies frequentemente geradas, destacam-se as ERO e ERN. Em ambas podemos encontrar moléculas reativas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo (classificados como espécies radicalares ou radicais livres) e moléculas que não possuem elétrons desemparelhados, porém possuem a capacidade de formar radicais livres (classe das espécies não radicalares) (Alhayaza *et al.*, 2020; Dumanović *et al.*, 2020; Otasevic *et al.*, 2020; Sies & Jones, 2020).

Dentre as ERN, destacamos as espécies radicalares óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) e dióxido de nitrogênio ($\text{NO}\bullet_2$), e não radicalares, como ácido nitroso HNO_2 , peroxinitrito (ONOO^-) e ácido peroxinitroso (ONOOH) (Figura 1) (Hameister *et al.*, 2020). Dentre as ERO mais comuns, são evidenciados os radicais livres ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$), alcóxila ($\text{RO}\bullet$) e hidroperoxila ($\text{HO}_2^{\bullet}$), enquanto as espécies não radicalares mais conhecidas são o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ozônio (O_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (Figura 2) (HOCl) (Halliwell & Gutteridge, 2015; Zhou *et al.*, 2021).

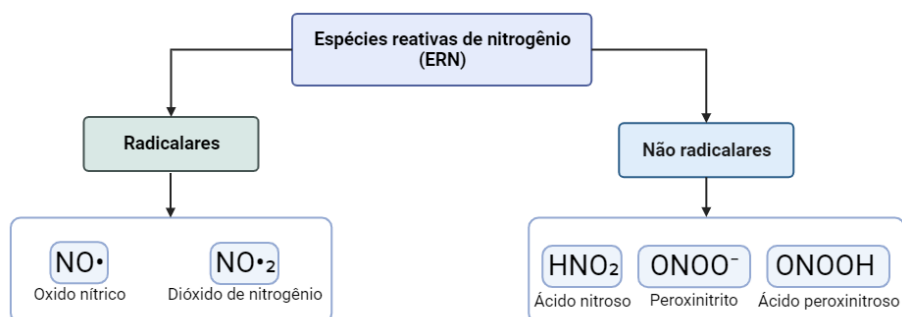


Figura 1. Classificação das espécies reativas de nitrogênio e seus exemplos de espécies radicalares e não radicalares.

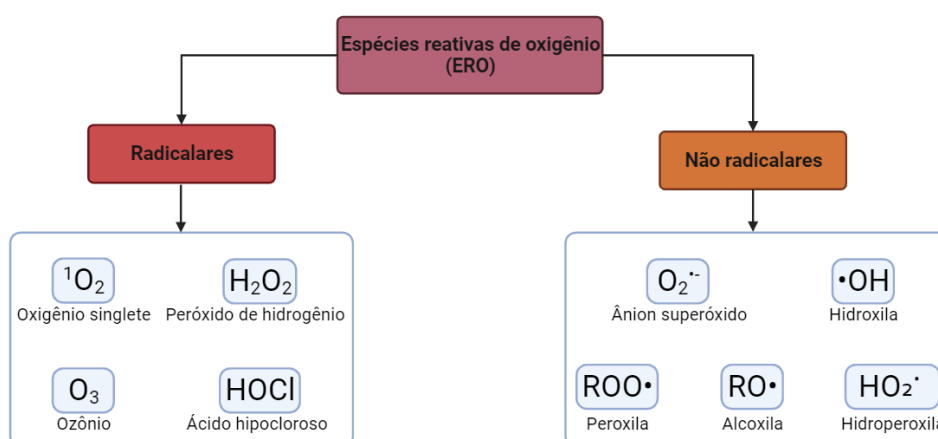


Figura 2. Classificação das espécies reativas de oxigênio e seus exemplos de espécies radicalares e não radicalares.

As ERO são derivadas do oxigênio molecular (O_2) e são formadas durante as reações redox que ocorrem fisiologicamente, em processos como fosforilação oxidativa, inflamações e fagocitose (Winterbourn *et al.*, 2016; Alhayza *et al.*, 2020; Sies & Jones 2020). Endogenamente, as ERO são geradas através de diferentes fontes e mecanismos (Figura 3) e acredita-se que na maioria dos tipos celulares, a mitocôndria seja a maior fonte de sua geração (Holmstrom & Finkel, 2014).

Nesta organela, mais especificamente na membrana mitocondrial interna, encontra-se a cadeia transportadora de elétrons (CTE), composta por cinco complexos de proteínas transmembrana (I – IV) e por proteínas móveis ubiquinona e citocromo C, que participam do processo de fosforilação oxidativa (Zhao *et al.*, 2019). Basicamente, o catabolismo de carboidratos, ácidos graxos e proteínas promove a formação de substratos (NADH: *Nicotinamida adenina dinucleotídeo* e $FADH_2$: *Flavina-adenina dinucleotídeo*) doadores de elétrons, que serão utilizados na CTE para síntese de ATP (Adenosina trifosfato) e para a redução do O_2 (aceptor final de

elétrons) em H_2O (Nolfi-Donagan *et al.*, 2020). Durante este processo, elétrons escapam da CTE e interagem com o O_2 , promovendo a formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Zhao *et al.*, 2019; Tirichen *et al.*, 2021).

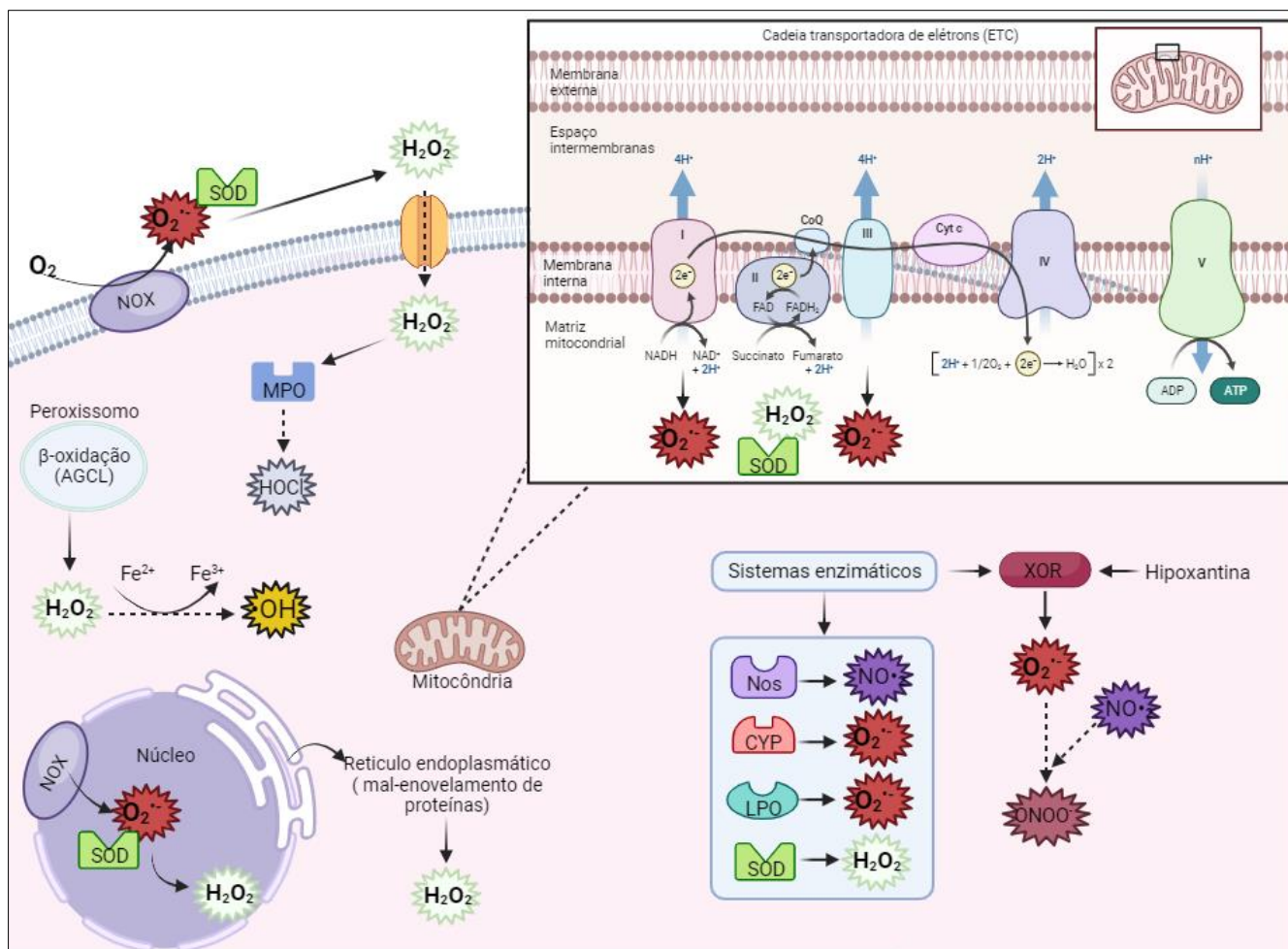


Figura 3. Fontes de produção de espécies reativas de oxigênio presentes na célula.

Fonte: o autor.

Legenda; SOD: superóxido dismutase, NOX: NADPH oxidase, $\text{O}_2^{\cdot-}$: ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, MPO: mieloperoxidase, HOCl : ácido hipocloroso, Fe^{2+} : íon ferroso, Fe^{3+} : íon férrico, AGCL: ácidos graxos de cadeia longa, NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida), NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada), FAD: flavina-adenina dinucleotídeo (forma oxidada), FADH_2 : flavina-adenina dinucleotídeo (forma reduzida), CoQ: ubiquinona, Cyt C: citocromo C, ADP: difosfato de adenosina, ATP: adenosina trifosfato, Nos: óxido nítrico sintase, CYP: citocromo P450, LPO: lipoxigenase, XOR: xantina oxidoreductase, $\text{NO}^{\cdot}$: óxido nítrico, ONOO^- : peroxinitrito.

As enzimas NADPH oxidases (NOX) presentes em membranas, são uma importante fonte de produção de ERO, catalisando a produção de $O_2^{\cdot-}$ a partir de O_2 e NADPH (Almeida *et al.*, 2022). Outras fontes de geração de ERO, como por exemplo o H_2O_2 , incluem o retículo endoplasmático durante o enovelamento de proteínas (Sies & Jones, 2020) e os peroxissomos durante a β -oxidação de ácidos graxos (Shields *et al.*, 2021). No citoplasma, enzimas como mieloperoxidases (MLO), citocromo P450 (CYP), lipoxigenases (LPO) e xantina oxidoredutases (XOR) são capazes de promover a geração de $O_2^{\cdot-}$ (Gutmann *et al.*, 2020; Lennicke & Cochemé, 2021; Almeida *et al.*, 2022). Adicionalmente, a presença de metais de transição como o ferro (Fe^{2+}) e seu contato com H_2O_2 podem gerar radicais $\cdot OH$, através da reação de Fenton (Hayes *et al.*, 2020), e o contato do $O_2^{\cdot-}$ com o $NO\cdot$ (ERN) pode levar a geração de $ONOO^-$ (Alhayaza, *et al.*, 2020).

Fisiologicamente, as espécies reativas são necessárias em concentrações basais, contribuindo para a realização de processos biológicos básicos (Mittler, 2017) e desempenhando funções regulatórias em vários processos homeostáticos (Falowo *et al.*, 2014). As ERO mediam seus efeitos biológicos por meio da oxidação reversível de grupos tiol em cisteínas de proteínas alvo, contribuindo para a sinalização redox, que controla as funções celulares modificando a atividade de enzimas e fatores de transcrição, bem como regulando a expressão gênica e modificações epigenéticas (Lennicke & Cochemé, 2021).

Os efeitos benéficos das ERO variam de acordo com suas concentrações no organismo, onde são capazes de atuar em processos de sinalização celular e comunicação intercelular (Sies & Jones, 2020). Em baixos níveis, as ERO possuem efeito citostático, contribuindo em processos como quiescência e também para boa manutenção da atividade imunológica, enquanto em níveis moderados auxiliam em processos como crescimento, renovação e diferenciação celular, participam na eliminação de patógenos durante infecções, processos inflamatórios, adaptação celular e proteção contra estresses, regulação metabólica e morte celular fisiológica (Schieber & Chandel, 2014; Mittler, 2017; Sies & Jones, 2020; Morshed *et al.*, 2023).

No entanto, em níveis elevados podem se tornar prejudiciais aos organismos vivos, promovendo parada do ciclo celular, inativação de moléculas, promoção de efeitos citotóxicos, oxidação inespecífica de proteínas e danos irreversíveis em biomoléculas, que são eventos associados a estados patológicos, como por exemplo

desenvolvimento de doenças autoimunes e câncer (Schieber & Chandel, 2014; Di Meo, *et al.*, 2016; Sies & Jones, 2020; Morshed *et al.*, 2023).

2.2. Defesas antioxidantes

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas, conhecido como homeostase redox (Sies & Jones, 2020). Nas células do organismo, esta condição é essencial para que ocorra a manutenção das funções celulares (D'souza *et al.*, 2020). Seguindo este raciocínio, a homeostase redox é mantida pelo equilíbrio entre os sistemas de oxidação e redução intracelulares (Ayer *et al.*, 2014; Mittler *et al.*, 2017). Um agente antioxidante pode ser qualquer substância ou enzima capaz de reagir diretamente com as ERO, ocasionando sua neutralização e/ou reduzindo danos oxidativos em outras moléculas (Lobo *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2020). Além disso, existem substâncias antioxidantes que são capazes de modular positivamente a expressão de genes antioxidantes, bem como quelar íons metálicos que participam em reações de formação de ERO (Bié *et al.*, 2023).

A defesa antioxidante é um mecanismo universal, presente em células de vegetais e animais, e atua eliminando e/ou neutralizando as ERO através de um complexo sistema enzimático e pela ação não enzimática de moléculas específicas produzidas endogenamente (Ali *et al.*, 2020; Hameister *et al.*, 2020). Adicionalmente, existe uma grande diversidade de antioxidantes de origem exógena, que são provenientes da alimentação ou suplementação e que se utilizados de maneira adequada, podem contribuir com a otimização das defesas antioxidantes endógenas do organismo e levar a promoção da saúde.

2.2.1. Antioxidantes endógenos enzimáticos

Dentre os antioxidantes enzimáticos que realizam este importante papel, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational peroxidase (GPx) e glutational redutase (GR) (Ali *et al.*, 2020), conforme ilustrado na Figura 4.

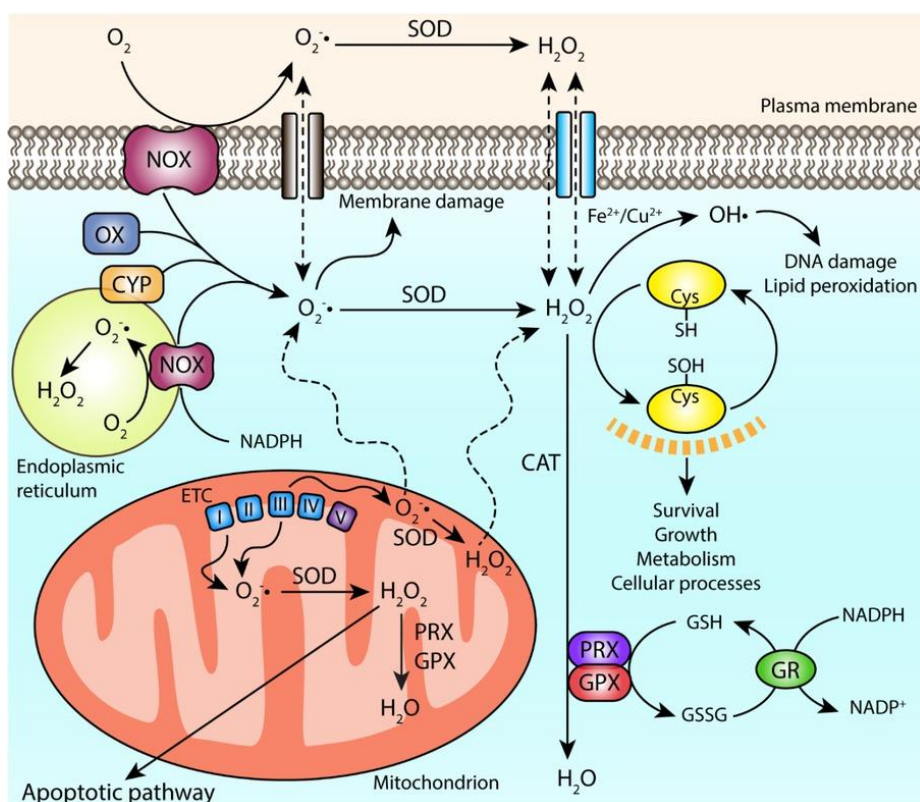


Figura 4. Atuação de mecanismos antioxidantes enzimáticos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio. Fonte: Adhikari *et al.*, (2019).

Legenda; OX: xantina oxidase citosólica (OX), CYP: citocromo P450, NOX: NADPH oxidase, ETC: cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, PRX: peroxirredoxina, Cys: cisteína, Fe^{2+} : íon ferroso, Cu^{2+} : íon cúprico, SOD: superóxido dismutase, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, $\text{O}_2^{\bullet-}$: radical ânion superóxido, GSH: glutatona reduzida, GSSG: glutatona oxidada, SH: sulfidril, SOH: ácido sulfênico, CAT: catalase, GPx: glutatona peroxidase, $\bullet\text{OH}$: radical hidroxila.

A SOD é considerada a primeira enzima na linha de defesa antioxidante, sendo responsável pela dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e oxigênio molecular (Ye *et al.*, 2015; Kirtonia *et al.*, 2020). Três isoformas de SOD são descritas, que incluem a forma dependente de cobre/zinco (Cu-Zn/SOD ou SOD1) presente no citoplasma, a forma dependente de manganês (Mn-SOD ou SOD2) localizada nas mitocôndrias e a forma extracelular (EC-SOD ou SOD3) (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009; LobO *et al.*, 2010).

O H_2O_2 produzido pela SOD é detoxificado através de reações enzimáticas catalisadas por catalases (Alhayaza *et al.*, 2020). Estas enzimas são localizadas

principalmente nos peroxissomos, e em menores concentrações, estão presentes em organelas como as mitocôndrias e retículo endoplasmático (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009; Ali *et al.*, 2020).

A GPx pode reduzir o processo de peroxidação lipídica em membranas celulares (Zulaikhah, 2017), além de realizar a detoxificação do H_2O_2 . Neste processo, as GPx utilizam a glutathione como substrato, catalisando reações com sua forma reduzida (GSH), formando glutathione oxidada (GSSH) e transformando o H_2O_2 em moléculas de H_2O (Carocho & Ferreira, 2013; Alhayaza *et al.*, 2020). Enquanto isso, a enzima GR presente no citosol, utiliza NADPH em reações de redução com a glutathione oxidada, mantendo uma proporção equilibrada entre GSH e GSSH (Lushchak *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2020). Adicionalmente, outro sistema enzimático que atua detoxificando o H_2O_2 é composto pelas enzimas peroxirredoxina (PRx), tioredoxina (Trx) e tioredoxinas redutases (TrxR) (Pedone *et al.*, 2020). As PRx são responsáveis por reduzir o H_2O_2 em H_2O , através da oxidação de seus resíduos de cisteína (inativação), as Trx transferem elétrons para PRx, ocasionando sua redução (ativação) e as TrxR reduzem os resíduos de cisteína de Trx, utilizando NADPH como cofator (Irazabal & Torres, 2020; Hayes *et al.*, 2020).

2.2.2. Antioxidantes endógenos não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos são como uma segunda linha de defesa contra possíveis efeitos desencadeados pelo excesso de espécies reativas. São considerados eliminadores e/ou inibidores de reações em cadeia de iniciação ou propagação de radicais livres (Nimse & Pal, 2015; Ighodaro & Akinloye, 2018). Fazem parte deste grupo, os antioxidantes intracelulares (glutathione, coenzima Q10 e melatonina) e os extracelulares (ácido úrico, transferrina e ceruloplasmina) (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

A glutathione é um tripeptídeo envolvido em muitas funções celulares, sendo o principal antioxidante não enzimático que contribui para a regulação da homeostase redox intracelular (Ali *et al.*, 2020). A presença do grupo tiol em seu resíduo cisteína, confere propriedades de redução e oxidação reversíveis (Lobo *et al.*, 2010). Como antioxidante hidrossolúvel, está presente em altas concentrações no núcleo, mitocôndrias e citoplasma, e possui a capacidade de reduzir ERO em reações

enzimáticas e não enzimáticas, seja doando elétrons ou um átomo de hidrogênio (Carocho & Ferreira, 2013; Moussa, 2019).

A coenzima Q10 é um antioxidante lipofílico, possui diferentes funções celulares, atua no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, neutraliza ou previne a formação de radicais lipídicos e reduz o α -tocoferol oxidado (Vitamina E) (Carocho & Ferreira, 2013; Acosta *et al.*, 2016; Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018). Em sua forma reduzida é conhecida como ubiquinol, e como ubiquinona na sua forma oxidada (Sarmiento *et al.*, 2016).

A melatonina é um hormônio pineal, e sua produção varia de acordo com o ritmo circadiano (Bonnefont-Rousselot, 2010). Possui capacidade antioxidante direta através da eliminação de radicais $\bullet\text{OH}$, detoxificando $^1\text{O}_2$ e ONOO^- , e atua indiretamente estimulando a expressão de enzimas antioxidantes (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

Dentre os antioxidantes extracelulares, o ácido úrico é o produto final do metabolismo de purinas, sendo sintetizado principalmente no fígado, intestinos e outros tecidos, como músculos e endotélio vascular (El Ridi & Tallima, 2017). É encontrado amplamente no plasma sanguíneo (Bagheri *et al.*, 2016) e é considerado um potente antioxidante fisiológico, capaz de quelar metais de transição como cobre e ferro (Sharma *et al.*, 2018), neutralizar ERO e prevenir a peroxidação lipídica através da estabilização de radicais lipídicos (Carocho & Ferreira, 2013; Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

Além destes, a transferrina é uma glicoproteína do plasma sanguíneo, um quelante do íon Fe^{3+} , sendo responsável por manter a solubilidade em condições fisiológicas, facilitar o transporte e captação celular e garantir o estado redox de Fe^{3+} , evitando a geração de radicais livres na reação de Fenton (Gkouvatsos *et al.*, 2012). A transferrina é sintetizada primariamente nos rins, além de outros órgãos como testículos e cérebro, e sua principal função consiste na transferência de ferro entre diferentes tecidos (Elsayed, 2016). Além disso, transporta o ferro absorvido para a medula óssea onde são produzidos os eritrócitos (Ogun & Adeyinka, 2021).

Outra glicoproteína antioxidante importante é a ceruloplasmina, responsável por transportar cerca de 95% do cobre no sangue (Healy & Tipton, 2007). A ceruloplasmina possui funções chave na homeostase do ferro, convertendo o íon Fe^{2+} em Fe^{3+} e na proteção dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares

dos eritrócitos, inibindo reações em cadeia de ERO (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

2.2.3. Antioxidantes exógenos

Além da capacidade do organismo em produzir as defesas antioxidantes para sua proteção, existem antioxidantes de origem exógena e que se ingeridos, podem compor uma linha de defesa antioxidante adicional e trazer uma série de benefícios à saúde.

Os antioxidantes dietéticos, como são conhecidos, são obtidos através da alimentação ou suplementação. Vegetais, frutas, chás e vinhos por exemplo, podem ser uma rica fonte de substâncias como o ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno (vitamina A) e tocoferóis/tocotrienóis (vitamina E). Além disto, podem apresentar moléculas bioativas como compostos fenólicos, flavonoides, alcaloides e/ou terpenos.

O ácido ascórbico, conhecido popularmente como vitamina C, participa de processos como a síntese de colágeno e de neurotransmissores, e é um excelente antioxidante hidrofílico (Carocho & Ferreira, 2013; Sinbad *et al.*, 2019). Em sua estrutura química há a presença de quatro hidroxilas, que conferem a capacidade de doar elétrons para estabilizar radicais livres, quelar íons metálicos catalisadores da formação de radicais livres, e de reduzir moléculas oxidadas (Brewer *et al.*, 2011; Nimse & Pal, 2015; Ali *et al.*, 2020). A vitamina C auxilia na prevenção da peroxidação lipídica, agindo diretamente em radicais livres dentro e fora da célula (Sinbad *et al.*, 2019). Entretanto, concentrações muito elevadas de tal substância, podem promover efeitos pró-oxidantes (Giansanti *et al.*, 2021).

A vitamina A é uma molécula lipossolúvel que pode se apresentar nas formas de retinol, retinal e ácido retinóico (Sommer, 2001; Huang *et al.*, 2018). Pode ser obtida na forma de vitamina A pré-formada, através da ingestão de alimentos de origem animal (fígado, óleos de peixe e leite) ou ser formada no fígado através do consumo na forma de pró-vitamina A (β -carotenos), proveniente de origem vegetal, como a manga, cenoura e espinafre (Carocho & Ferreira, 2013; Maia *et al.*, 2019). Sua atividade antioxidante é descrita como a capacidade de inibir a propagação em cadeia de danos em lipídeos, através da sua captura de radicais livres (Jee *et al.*, 2006; Dao *et al.*, 2017).

Além destes, a vitamina E também é um antioxidante lipossolúvel, sendo composto por quatro isoformas de tocoferóis (α -, β -, γ -, e δ -tocoferóis) e quatro isoformas de tocotrienóis (α -, β -, γ -, e δ -tocotrienóis) (Lee *et al.*, 2018a; Sinbad *et al.*, 2019). Esta vitamina desempenha um papel importante na proteção da membrana plasmática, interrompendo a peroxidação lipídica ao doar átomos de hidrogênio para radicais peroxila, quebrando assim, a reação oxidativa em cadeia da formação de radicais lipídicos (Carocho & Ferreira, 2013; Nimse & Pal, 2015). Em adição, a vitamina E pode ser encontrada amplamente em óleos vegetais (Lee *et al.*, 2018a).

2.3. Estresse oxidativo

Sabidamente, as células produzem ERO e ERN como uma consequência do metabolismo (Hayes *et al.*, 2020). Em condições ideais, seus níveis são mantidos constantes, e atuam sobre alvos fisiológicos para realização da transdução de sinais e respostas celulares (Sies & Jones, 2020). Embora suas funções sejam cruciais para o organismo (MITTLER, 2017), as espécies reativas também podem promover efeitos deletérios (Sies & Jones, 2020; Almeida *et al.*, 2022). Dessa forma, para manter a integridade celular e prevenir danos macromoleculares, é essencial que os níveis de ERO sejam rigidamente regulados (Alnajjar & Sweasy, 2019).

O estresse oxidativo é um estado em que há elevadas concentrações de ERO em relação as defesas antioxidantes presentes em um sistema biológico (Aggarwal *et al.*, 2019; Alhayaza *et al.*, 2020). A condição é marcada por um desequilíbrio em favor das ERO, desta maneira as defesas antioxidantes não conseguem atuar eficientemente em sua neutralização (D'souza *et al.*, 2020; Hameister *et al.*, 2020). Este desbalanço pode surgir através de fatores exógenos, que são capazes de induzir um aumento na formação de ERO (Figura 5). Tais fatores variam de acordo com o ambiente em que o indivíduo se encontra e também de acordo com sua qualidade de vida.

Como fatores exógenos ambientais estão inclusos a exposição solar excessiva, inalação de fumaças (queimadas, poluição, cigarros), radiações ionizantes e contato com reagentes químicos (Ranneh *et al.*, 2017). Enquanto fatores exógenos associados a qualidade de vida são relacionados aos hábitos e incluem privação ou sono de má qualidade, estresse, má alimentação/nutrição deficiente, consumo

excessivo de álcool e tabagismo (Saha *et al.*, 2017; Ullah *et al.*, 2019; Vaccaro *et al.*, 2020).

Como as ERO são moléculas altamente reativas e instáveis, durante o estado de estresse oxidativo, diferentes biomoléculas que atuam em funções fisiológicas importantes no organismo podem ser alvos inespecíficos do seu alto poder oxidativo, incluindo as membranas fosfolipídicas, proteínas e o DNA (Figura 5) (Bhardwaj & He, 2020; Hayes *et al.*, 2020; Sies & Jones, 2020).

Os efeitos deletérios nestas macromoléculas são conhecidos como peroxidação lipídica, oxidação proteica e danos oxidativos ao DNA (Sairazi & Sirajudeen, 2020) e além de promover o envelhecimento celular (Hajam *et al.*, 2022), podem trazer consequências fisiopatológicas, como diabetes, doenças neurológicas, inflamatórias e câncer (Yang & Lian, 2020).

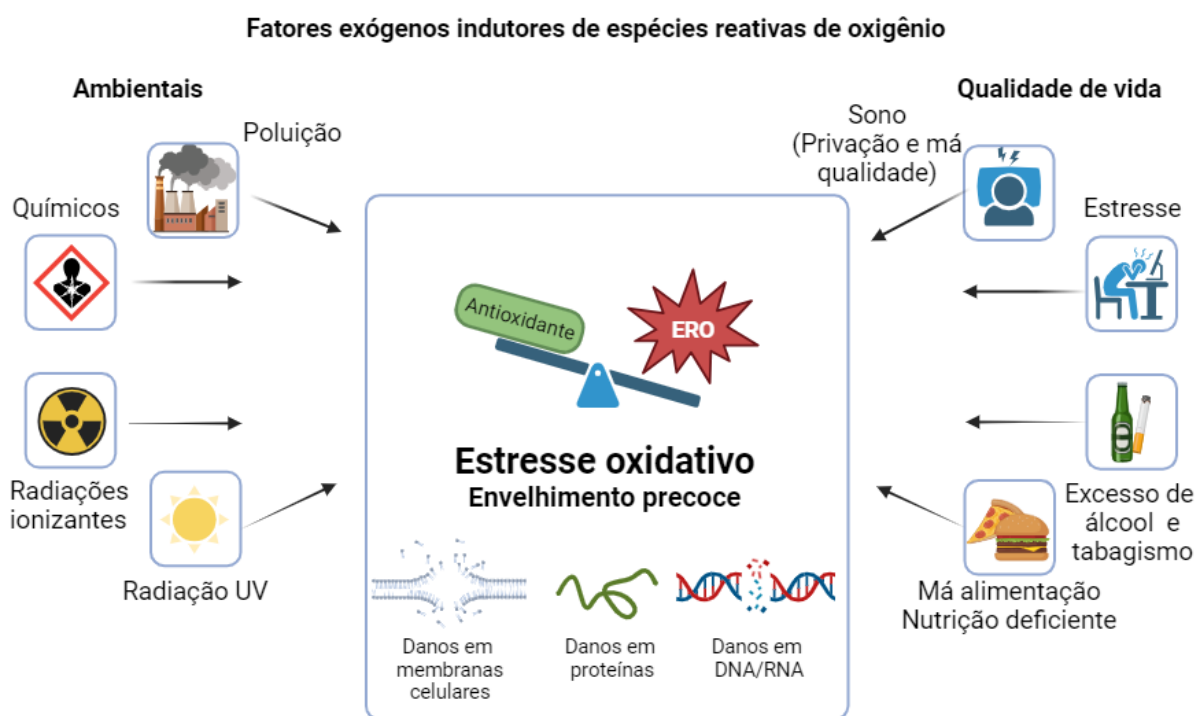


Figura 5. Fatores exógenos de ERO e seus efeitos sobre a saúde humana por meio de danos a macromoléculas. Fonte: o autor, 2023.

A peroxidação lipídica é um processo sequencial, caracterizado pelo ataque de radicais livres aos ácidos graxos poli-insaturados que formam a membrana bicamada das células (Ursini & Maiorino, 2020). O processo é dividido em iniciação, propagação e terminação, caracterizando a reação em cadeia de danos oxidativos que promovem a alteração da composição, estrutura e a perda da integridade das membranas

lipídicas (Gaschler & Stockwell, 2017). Os subprodutos resultantes deste processo, podem interagir com outros componentes celulares, como proteínas e DNA, promovendo distúrbios celulares (Gęgotek & Skrzydkewska, 2019).

Os radicais livres ($\bullet\text{OH}$) ou hidroperoxila ($\text{HO}_2\bullet$) são destaque na etapa de iniciação, onde podem retirar um átomo de hidrogênio de um carbono alílico, entre as duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados (AGP), gerando um radical centrado em carbono, que tende a se estabilizar por rearranjo molecular e formar um dieno conjugado, que reage com o oxigênio molecular para formar o radical lipídico $\text{ROO}\bullet$ (Gaschler & Stockwell, 2017; Dodson *et al.*, 2019). Os radicais $\text{ROO}\bullet$ são responsáveis por propagarem reações em cadeia de radicais livres, retirando átomos de hidrogênio de outros AGP, formando hidroperóxidos lipídicos e mais radicais centrados em carbono (Sies & Jones, 2020; Ursini & Maiorino, 2020).

As reações de propagação serão finalizadas na etapa de terminação, quando a concentração de radicais livres for suficiente para sua interação e eliminação ou pela sua estabilização por antioxidantes (Gaschler & Stockwell, 2017). Adicionalmente, os hidroperóxidos lipídicos formados na peroxidação lipídica, sofrem reações de fragmentação oxidativa, formando subprodutos de degradação lipídica que são altamente tóxicos para organismo, como o 4-hidroxinonenal (4-HNE), que reage com proteínas, e malondialdeído (MDA) que reage com o DNA, promovendo danos estruturais e funcionais, que contribuem para o desenvolvimento de doenças (Gęgotek & Skrzydkewska, 2019).

Outro efeito prejudicial que pode ser promovido pelo excesso de ERO no organismo é a oxidação de proteínas, classe de macromoléculas primordial para o metabolismo e homeostase celular, tendo em vista suas funções na sinalização e estrutura celular, além de processos enzimáticos (Cecarini *et al.*, 2007). As proteínas possuem sensibilidade elevada a danos oxidativos, que podem afetar estruturas secundárias, terciárias, promover modificações irreversíveis e consequentemente perda de sua função (Tramutola *et al.*, 2017).

Nas proteínas, os efeitos prejudiciais podem ser promovidos através da modificação oxidativa de aminoácidos específicos, clivagem de peptídeos mediadas por ERO, conjugação com subprodutos da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas catalisada por metais (Cecarini *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Xiong & Guo, 2021).

A oxidação (reação com ERO) ou nitrosilação (reação com ERN) de proteínas, são capazes de alterar a estrutura de uma proteína, incorporando novos grupos funcionais (Fedorova *et al.*, 2014). Dentre estes, a carbonilação (formação de carbonilas), é uma consequência comum da oxidação de proteínas, que pode surgir via modificação direta das cadeias laterais de aminoácidos por ERO (Xiong & Guo, 2021).

A carbonilação é caracterizada como uma modificação pós-traducional irreversível, que forma grupos carbonila (aldeído, cetona ou lactama) em uma proteína, através da reação com ERO, como o $\bullet\text{OH}$ (Suzuki *et al.*, 2010; Fedorova *et al.*, 2014). Os grupos carbonila podem ser gerados diretamente através da oxidação das cadeias laterais de aminoácidos suscetíveis (arginina, lisina, prolina, treonina), ou a partir da clivagem de ligações peptídicas via α -amidação (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Maisonneuve *et al.*, 2009). Por outro lado, a nitração de proteínas pode ocorrer após a formação de ONOO^- , a partir do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e do $\bullet\text{NO}$ (Tramutola *et al.*, 2017), e consiste na adição de um grupo nitro ($-\text{NO}_2$) em ortocarbonos do anel aromático de resíduos de tirosina, triptofano, cisteína ou metionina (Corpas *et al.*, 2009). O evento pode ocasionar a perda ou ganho de funções, e inativação ou aumento na taxa da degradação da proteína (Webster & Myatt, 2008).

As ERO também podem atacar ligações peptídicas, formando fragmentos de proteínas (Xiong & Guo, 2021). Geralmente, a clivagem da estrutura de um peptídeo é iniciada pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ que media a formação de $\text{RO}\bullet$ no carbono- α próximo a ligação peptídica (Kehm *et al.*, 2021). Posteriormente, a indução de clivagem de ligações peptídicas ocorre pela via de α -amidação ou via diamida (Ahmad *et al.*, 2017). Na via de α -amidação a ligação carbono-nitrogênio que abrange o sítio de radicalização do carbono- α pode sofrer clivagem homolítica, formando um derivado N- α -cetoacil e um radical amida, enquanto na via diamida, a ligação carbono-carbono do esqueleto do peptídeo, pode sofrer clivagem hemolítica e formar uma diamida e um radical isocianato (Stringfellow *et al.*, 2014).

Outra forma de oxidação proteica envolve os subprodutos da peroxidação lipídica. Estes compostos são considerados fortes eletrófilos, ou seja, possuem capacidade de reagir rapidamente com grupos nucleofílicos de proteínas, como, por exemplo, cadeias laterais de lisina, cisteína e histidina (Fedorova *et al.*, 2014). Desta forma, a interação de proteínas com os subprodutos da peroxidação lipídica, como os

aldeídos α,β -insaturados (4-hidroxinonenal e acroleína) e di-aldeídos (malondialdeído e glioxal), também pode ocasionar a formação de grupos carbonila (Suzuki *et al.*, 2010).

Além destes, outro mecanismo comum da indução de danos oxidativos em proteínas é a oxidação catalisada por metais. Neste caso, a produção de H_2O_2 e a presença de íons de Fe^{2+} são os elementos principais da reação de Fenton, cujo produto são os $\bullet OH$, responsáveis por realizar ataques às cadeias laterais de aminoácidos (Ahmad *et al.*, 2017; Xiong & Guo, 2021). Adicionalmente, os aminoácidos mais sensíveis a oxidação são aqueles com grupos de cadeias laterais aromáticas e aqueles contendo grupos sulfidríla (Cecarini *et al.*, 2007).

Proteínas oxidadas não podem ser reparadas por enzimas celulares, e caso não sejam eliminadas através de vias proteassomais ou lisossomais, podem se acumular e formar agregados, que por sua vez, podem promover disfunção e morte celular por apoptose ou necrose (Cecarini *et al.*, 2007; Fedorova *et al.*, 2014). Além disso, os processos danosos de oxidação, são capazes de desencadear alterações na atividade de enzimas, de receptores, em mecanismos de transdução de sinais, no transporte de membrana, e na suscetibilidade à proteólise, e consequentemente contribuir para desenvolvimento de doenças e envelhecimento precoce (Lobo *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2022; Hajam *et al.*, 2022).

Os radicais livres também atacam os ácidos nucleicos. Vários tipos de danos podem ser induzidos por estes ataques, incluindo a formação de sítios abásicos (DNAapurínico/apirimidínico), oxidação de pirimidinas e purinas, formação de adutos de DNA e quebras de DNA de fita simples e de fita dupla (Kryston *et al.*, 2011; Shi & Dansen, 2020).

O radical $\bullet OH$ é considerado o radical mais biologicamente ativo, e tem predominantemente o DNA como alvo (Sharma *et al.*, 2016). Por exemplo, radicais $\bullet OH$ podem se ligar ao DNA e consequentemente, danificar a estrutura da desoxirribose, incluindo bases pirimidínicas e purinas (Saha *et al.*, 2017). O contato do $\bullet OH$ com as pirimidinas (timina (T) e citosina (C)) nas posições 5 ou 6 do anel heterocíclico, promove várias lesões de base (Kryston *et al.*, 2011). De acordo com a literatura, os radicais $\bullet OH$ podem interagir com nucleobases de timina, citosina, guanina (G) e adenina (A), através de reações de adição (formação de adutos) ou

através da abstração de átomos de hidrogênio de sua estrutura química (Dizdaroglu & Jaruga, 2012; Cadet & Wagner, 2013).

Além disso, como já mencionado, a interação de radicais hidroxila com o material genético também possibilita a quebra de DNA de fita simples e de fita dupla. O mecanismo consiste na abstração de átomos de hidrogênio da 2-desoxirribose, levando à formação de radicais à base de carbono, que na presença de oxigênio podem ser convertidos em radicais ROO•, que também podem abstrair átomos de hidrogênio de porções de açúcar, levando a quebras da fita de DNA (Kryston *et al.*, 2011). Quebras no DNA de fita dupla são potencialmente perigosas, podendo promover mutagenicidade devido a rearranjos cromossômicos ou perda de informação genética em caso de erros no reparo de DNA (Srinivas *et al.*, 2019).

Os danos promovidos ao DNA por lesões oxidativas são fatores desencadeadores de mutações, instabilidade genômica e consequentemente do processo carcinogênico (Alnajjar & Sweasy, 2019). Além da perda do material genético, o estresse oxidativo pode promover anormalidades cromossômicas, como a translocação e fusão aberrante de cromossomos quebrados e ativação de oncogenes, promovendo o câncer (Pizzino *et al.*, 2017; Shi & Dansen, 2020).

Em adição, além dos danos oxidativos que podem ser promovidos em membranas celulares, proteínas e DNA, as ERO podem influenciar na ativação de receptores de tirosina quinase (RTK's), e alguns exemplos de vias pró-oncogênicas que podem ser ativadas por ERO no desenvolvimento do câncer são P13K/AKT/mTOR, NF-κB e RAS/MAPK (D'souza *et al.*, 2020; Kirtonia *et al.*, 2020).

2.4. Câncer

O câncer é um termo que caracteriza um grande conjunto de doenças em que células anormais surgem em qualquer parte do corpo, sendo sua característica principal a proliferação descontrolada (Organização Mundial da Saúde – OMS, 2023). O câncer é a segunda causa de morte em todo o mundo (American Cancer Society, 2023), ficando somente atrás de doenças cardiovasculares (Ritchie & Roser, 2018) (Figura 6). Globalmente, uma a cada seis óbitos é ocasionada pela doença (OMS, 2022) e em 2020, foi responsável por quase 10 milhões de óbitos (Sung *et al.*, 2021).

Number of deaths by cause, World, 2019

↔ Change country

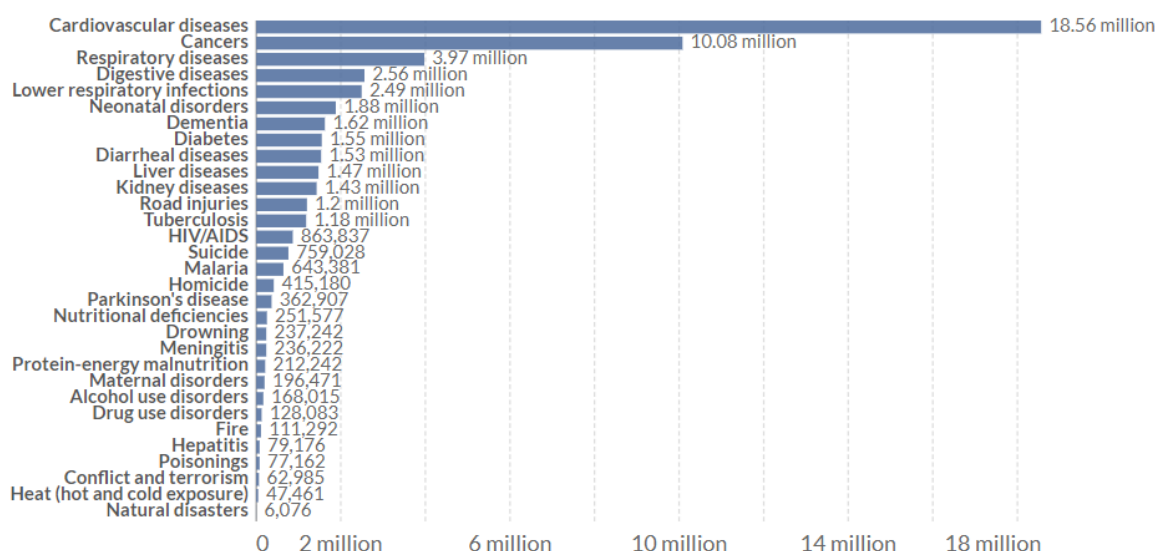


Figura 6. Número de óbitos no mundo, promovidos por diferentes causas no ano de 2019. Fonte: RITCHIE & ROSER, 2018 em Our World in Data. (URL: <https://ourworldindata.org/grapher/annual-number-of-deaths-by-cause>).

Câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns em homens, enquanto câncer de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e tireoide são os mais comuns entre as mulheres (Figura 7) (American Cancer Society, 2018). Segundo o Global Cancer Observatory (GLOBOCAN, 2024a), em 2040 o número global de casos deverá aumentar para 29,9 milhões, com 15,3 milhões de mortes ocasionadas pela doença (GLOBOCAN 2024b).

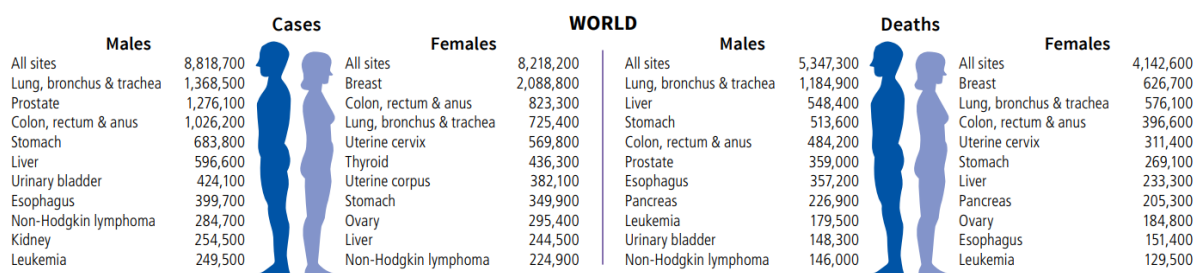


Figura 7. Estimativa de casos de câncer e mortes em todo mundo, no ano de 2018. (Exceto câncer de pele não-melanoma). Fonte: American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 4th Edition. Atlanta: American Cancer Society; 2018.

No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi estimada a ocorrência de 704 mil novos casos para cada ano do triênio de 2023-2025 (Santos *et al.*, 2023). Dentre estes, com exceção do câncer de pele não melanoma, a estimativa dos tipos de câncer mais frequentes em homens incluem próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral. Em mulheres, câncer de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide irão figurar entre os principais (Tabela 1).

Tabela 1. Incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo para homens e mulheres para o ano de 2023. (Fonte: INCA – Santos *et al.*, 2023)

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

2.4.1. O processo carcinogênico

O corpo humano é constituído por cerca de 30 trilhões de células, que se organizam e formam tecidos e órgãos. Em um corpo saudável, as células possuem um ciclo de vida muito bem estabelecido, onde se dividem, amadurecem, realizam suas funções fisiológicas e morrem (Healthline, 2018). Este processo pode ser interrompido, seja por meio de eventos epigenéticos ou acúmulo de mutações que alteram vias de regulação relacionadas a processos de proliferação, apoptose, imortalização, motilidade, replicação e reparo do DNA, invasão e adesão (Fouad & Aanei, 2017; Poltavets *et al.*, 2018; Nobili *et al.*, 2020).

Células que sofreram alteração em vias de regulação, estão suscetíveis a promover o desenvolvimento de um câncer, apresentado certas características em relação às células normais (Loeb & Harris, 2008). Estas características são denominadas “*Hallmarks of Cancer*” ou marcas registradas do câncer. São capacidades biológicas conhecidas como: evasão de supressores de crescimento, escape de destruição imunológica, ativação de imortalidade replicativa, promoção de inflamação pelo tumor, ativação de invasão e metástases, indução de angiogênese, instabilidade genômica e mutações, resistência a morte celular, desregulação do

metabolismo celular e sustentação da sinalização proliferativa (Figura 8) (Hanahan, 2022). As células podem adquirir estas características durante o processo de carcinogênese, conferindo malignidade a doença (Block *et al.*, 2015).



Figura 8. *Hallmarks of cancer* (marcas registradas do câncer). Fonte: Hanahan., (2022) (adaptado).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo e envolve múltiplas etapas que surgem devido a alterações moleculares e celulares, especialmente de origem genética (Imran *et al.*, 2017; Biswal *et al.*, 2017). De acordo com a literatura, três etapas estão envolvidas neste processo, e são denominadas de iniciação, promoção e progressão (Trosko *et al.*, 2013; Siddiqi *et al.*, 2015; Vega *et al.*, 2018). Estas etapas são inter-dependentes com os eventos relacionados ao desenvolvimento do tumor, como (I) a construção de um nicho: interação da célula transformada com células normais e do estroma durante a etapa de iniciação para sobrevivência, (II) expansão: durante a promoção, células transformadas adquirem mais mutações, se expandem e ativam vias de sinalização oncogênicas que recrutam células do sistema imunológico e fibroblastos, e (III) maturação: aumento da interação com o estroma e com células progenitoras da medula óssea, angiogênese e formação do microambiente tumoral (Figura 9) (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013).

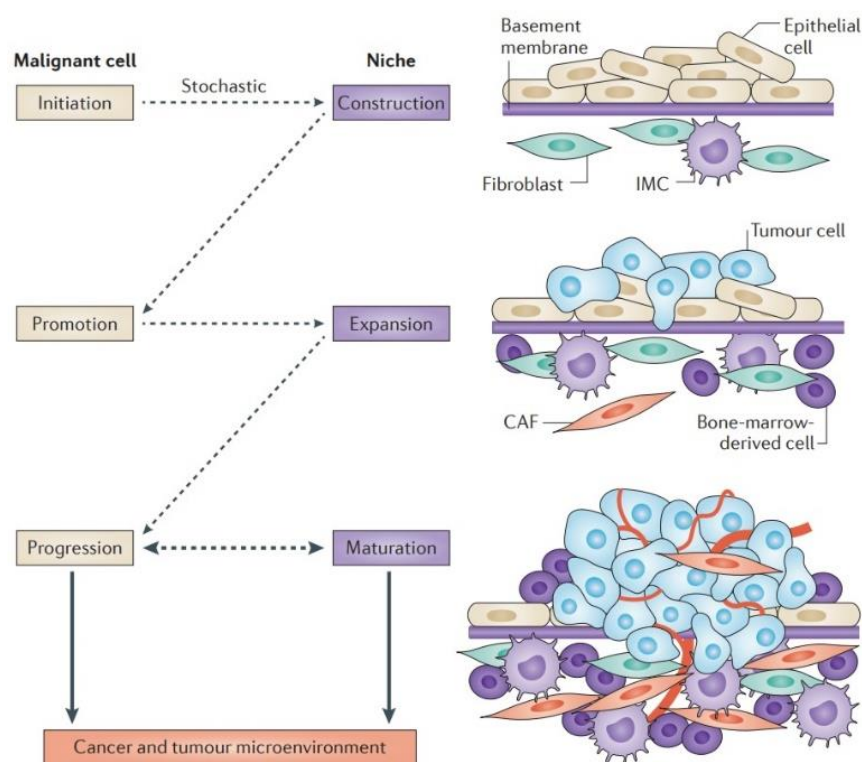


Figura 9. Representação esquemática dos eventos da formação de um tumor primário e sua interdependência com os estágios do processo carcinogênico. Fonte: Barcellos-Hoff *et al.*, (2013). Legenda; CAF: fibroblasto associado ao câncer, IMC: célula mielóide imatura.

A fase de iniciação da carcinogênese é resultante de extensivos danos ao DNA, ocasionados por uma variedade de fatores de origem exógena, incluindo exposição a produtos químicos mutagênicos, radiação ultravioleta, hábitos individuais prejudiciais (tabagismo, dieta inadequada, consumo excessivo de álcool), e/ou por fatores de origem endógena, como sistema imunológico comprometido e predisposição genética (George *et al.*, 2017; Rawla *et al.*, 2019; Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2021).

Uma vez que uma célula normal é exposta ao agente carcinogênico, mutações podem ser promovidas, resultando na disfunção de genes e alteração de funções celulares (Hassanpour & Dehghani, 2017). Os proto-oncogenes são os responsáveis pela regulação positiva da divisão e diferenciação celular, enquanto os genes de supressão tumoral possuem um papel regulatório negativo sobre estes eventos (Kontomanolis *et al.*, 2020). Desarranjos cromossômicos ou mutações gênicas podem converter os proto-oncogenes em oncogênes, e/ou levar a perda da função inibitória dos genes de supressão tumoral (Imran *et al.*, 2017). Tais alterações resultam na

desregulação de vias de sinalização intracelulares associadas a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Siddiqui *et al.*, 2015), desencadeando a transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena (Savant *et al.*, 2018).

O processo de promoção é marcado pela proliferação descontrolada da célula transformada e seu consequente acúmulo, amplificação de mutações presentes na população de células em expansão e formação do tumor (Loeb & Harris, 2008; Block *et al.*, 2015; Lopez *et al.*, 2021). Na fase de progressão, o microambiente tumoral (composto por células mieloides imaturas, fibroblastos e macrófagos associados ao tumor) libera o VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*), levando a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), auxiliando no desenvolvimento do câncer, através da liberação de citocinas, quimiocinas e outros fatores de crescimento (Barcellos-Hoff, *et al.*, 2013; Baghban *et al.*, 2020).

Conforme este desenvolvimento, mutações adicionais em genes de morte, sinalização e diferenciação celular podem ser desencadeadas, promovendo a presença de combinações únicas de alterações genéticas e levar sucessivamente a expansão do tumor (Compton, 2020).

Como resultado, o tumor adquire características malignas, que incluem principalmente a proliferação rápida e incontrolável de células cancerosas e capacidade de invasão e formação de metástases, atingindo partes adjacentes do corpo e/ou espalhando-se para outros órgãos.

2.4.2. Metástases

Ao apresentar os *Hallmarks of cancer*, as células neoplásicas continuam a evoluir no hospedeiro e podem formar metástases, que marcam o estágio final da progressão de um câncer (Gui & Bivona, 2022). Neste caso, a doença pode ser denominada como câncer metastático ou como câncer de estágio IV (último estágio), como é chamada em muitos tipos de câncer (National Institute of Health, 2020).

Durante a progressão da doença, células cancerígenas de um tumor primário podem disseminar-se através do sistema circulatório ou linfático, invadir e colonizar outros tecidos ou órgãos e formar tumores secundários (Nobili *et al.*, 2020; Birkbak & Mcgranahan, 2020; Zhong *et al.*, 2020). Neste processo, as células cancerosas devem superar obstáculos específicos para se disseminar com sucesso e se estabelecerem em um local secundário (Block *et al.*, 2015). Para formar um novo tumor, estas células

iniciam a cascata metastática, um processo constituído por etapas biológicas sequenciais, denominadas de invasão, intravasão, circulação, extravasão e colonização (Figura 10) (Savant *et al.*, 2018; Fares *et al.*, 2020).

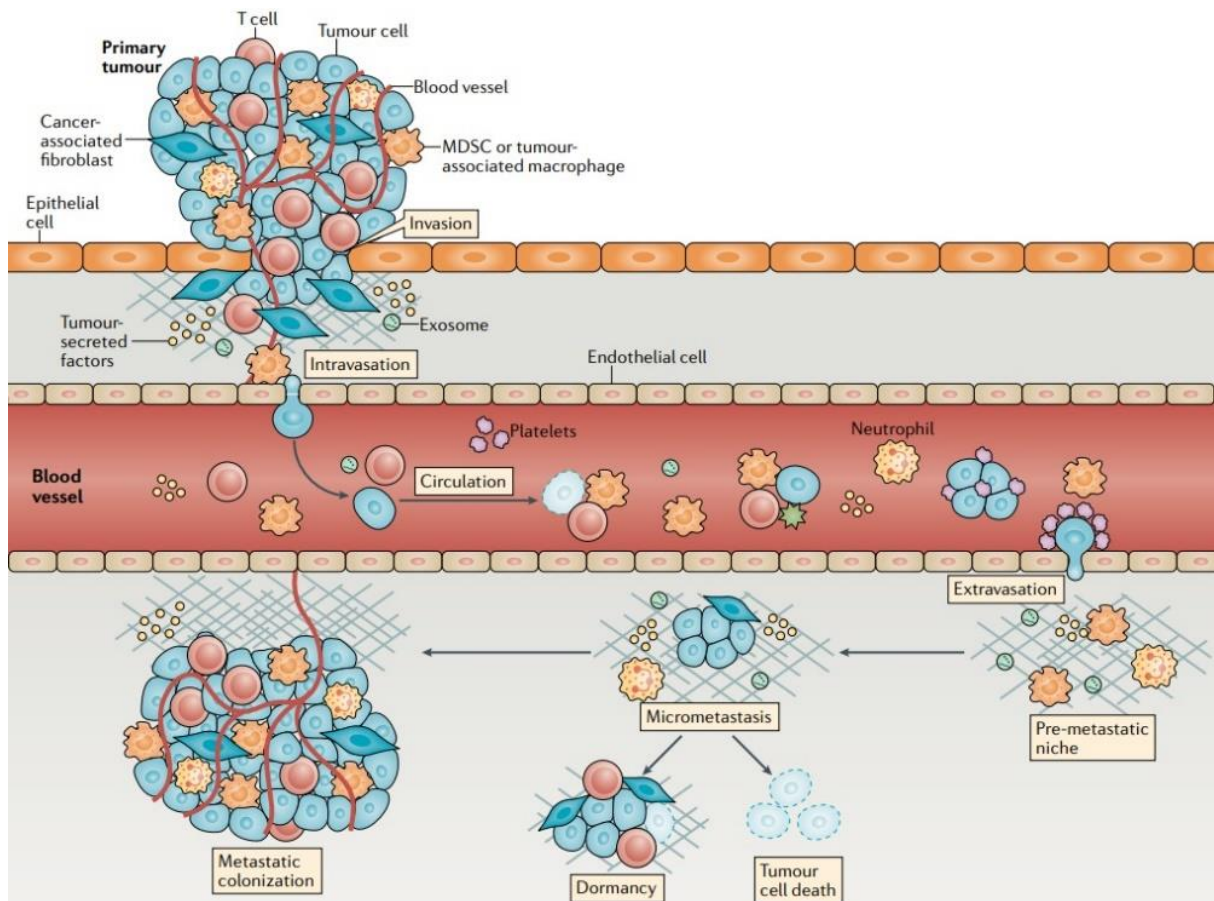


Figura 10. Visão global da cascata metastática. Fonte: Anderson *et al.*, (2019).
Legenda; MDSC: células supressoras mieloderivadas.

Inicialmente, as células tumorais precisam desprender-se do tumor primário (Li *et al.*, 2019a). E para isto, passam pela transição epitélio-mesenquimal (EMT), onde ocorre a perda de proteínas de junção de células epiteliais (E-caderinas, ocludinas e citoqueratinas) e expressão de proteínas mesenquimais (N-caderina, vimentina e fibronectina) (Mittal *et al.*, 2018). Estes eventos induzem a perda da adesão célula-célula e remodelação do citoesqueleto celular (Zhang *et al.*, 2013; Basu *et al.*, 2018), conferindo motilidade e capacidade de migração (Martin *et al.*, 2013) (Figura 11).

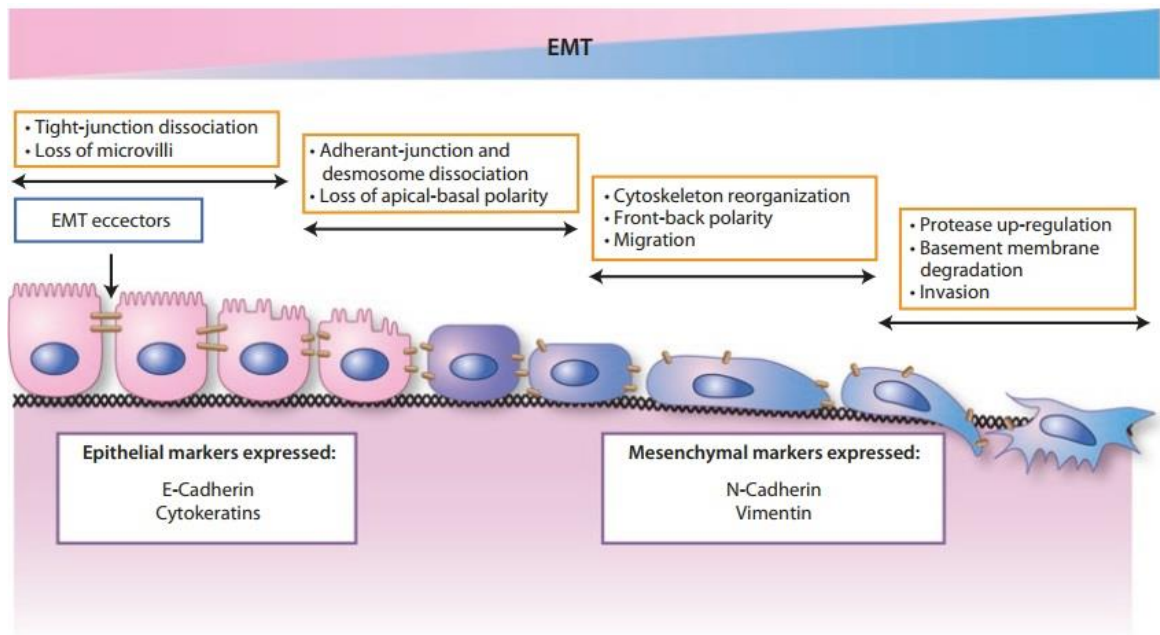


Figura 11. Representação esquemática da transição epitélio-mesenquimal. Fonte: Compton., 2020.

Posteriormente, por meio da síntese de proteases conhecidas como catepsinas e metaloproteínas, as células tumorais rompem a membrana basal do tumor primário e começam a degradar a matriz extracelular para adentrar outras regiões do corpo (Smith & Kang, 2013; Welch & Hurst, 2019; Bergers & Fendt 2021).

Após a invasão local, as células tumorais realizam a etapa de intravasão, entrando no sistema linfático ou circulatório (Welch & Hurst, 2019). A maioria dos casos de intravasamento, ocorrem a partir dos vasos sanguíneos (Chiang *et al.*, 2016).

Sinais quimiotáticos derivados do microambiente tumoral, estimulam as células de um tumor primário a migrarem para as regiões vasculares, através da degradação da matriz extracelular ou por invasão ameboide (Zavalyova *et al.*, 2019). O intravasamento de células tumorais em vasos sanguíneos está intimamente associado a barreira vascular, composta de perícitos e principalmente de células endoteliais (Yan & Jurasz, 2016; Li *et al.*, 2019b; Smeda *et al.*, 2020).

As células tumorais podem adentrar na circulação sanguínea através do processo de migração transendotelial, que pode ser realizado paracelularmente (entre as junções das células endoteliais) ou transcelularmente (através do corpo das células endoteliais) (García-Román *et al.*, 2013; Herman *et al.*, 2019). Alguns eventos moleculares que contribuem para realização destes processos são: (I) MMP-1 (*matrix metalloproteinase-1*) liberadas pelas células tumorais ativam receptores PAR1 (*Protease-activated receptor 1*) presentes em células endoteliais, e induzem o aumento da permeabilidade vascular e remodelação das junções endoteliais, fornecendo um canal de intravasamento, (II) ADAM-12 (*A disintegrin and metalloprotease 12*) pode clivar caderinas e receptores de angiopoetina 1 (TIE2) das células endoteliais e ocasionar a disrupção de junções endoteliais, e (III) fator de necrose tumoral (TNF- α 1) liberado por macrófagos induz a retração das junções endoteliais, facilitando a migração transendotelial (Figura 12) (Reymond *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019b).

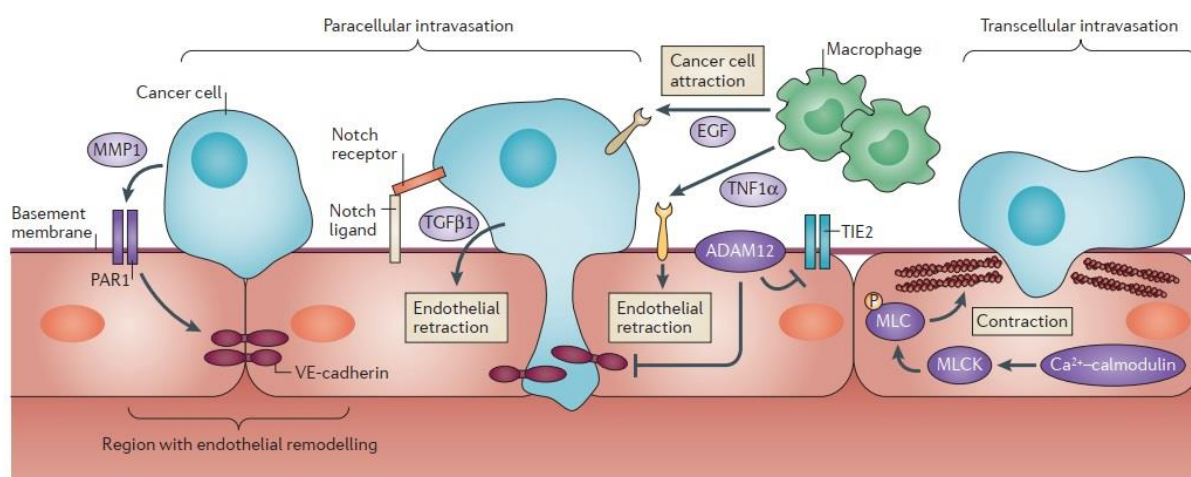


Figura 12. Representação esquemática dos mecanismos que podem contribuir para a entrada de células cancerígenas na vasculatura (intravasão). Fonte: Reymond *et al.*, (2013).

Uma vez na circulação sanguínea, as células tumorais se movem por mecanismos de motilidade ativa ou passiva (empurradas de acordo com o fluxo sanguíneo) (Welch & Hurst, 2019). As células invasoras são conhecidas como células tumorais circundantes (CTC's), podendo locomover-se isoladas ou em grupos, e espalhar-se amplamente através da circulação venosa e arterial (Valastyan & Weinberg, 2011; Lambert *et al.*, 2017). No entanto, devem ser capazes de sobreviver a alguns obstáculos, tais como danos físicos por forças de cisalhamento

hemodinâmicas e morte mediada por células do sistema imunológico (Chiang *et al.*, 2016).

Interações das CTC's com outras células presentes no ambiente vascular contribuem para sua adaptação e sobrevivência no ambiente. Dentre estas, a ativação das plaquetas pelas CTC's promove a agregação destas ao redor das CTC's, formando uma espécie de escudo que fornece estrutura para suportar o estresse físico ocasionado pela circulação sanguínea e impedir a detecção por células imunológicas (Gay *et al.*, 2011; Yan & Jurasz, 2016).

Adicionalmente, fatores biológicos secretados por plaquetas e CTC's influenciam monócitos e células endoteliais, facilitando a migração transendotelial para fora da circulação (Lambert *et al.*, 2017). Neste evento, o microambiente tumoral em conjunto com outras células imunológicas, incluindo neutrófilos, liberam citocinas que ocasionam o aumento de proteínas de adesão (ANGPTL4, ICAM-1, VCAM-1) e fibronectina em células endoteliais, contribuindo com a parada, adesão e extravasão das CTC's (Smith & Kang, 2013).

Células tumorais que extravasaram reestabelecem suas características epiteliais, revertendo o processo de EMT, conhecido como transição mesenquimal-epitelial (MET) (Compton, 2020). Dentre as milhares de CTC's que intravasaram na circulação sanguínea, apenas um pequeno grupo consegue sobreviver e extravasar para outras regiões do organismo, sendo conhecidas como células tumorais disseminadas (CTD's) (Liskova *et al.*, 2020). Durante o início da etapa de colonização, em um determinado novo tecido do organismo, três cenários podem ocorrer com as CTD's: (I) morte celular, (II) proliferação no novo microambiente, formação de micro e macrometástases e (III) ativação do estado de dormência (Reymond *et al.*, 2013).

Células tumorais conseguem sobreviver a morte celular e completar a etapa de colonização através do seu estabelecimento em um ambiente propício para o seu desenvolvimento (Smith & Kang, 2013; Anderson *et al.*, 2019). Esse ambiente é conhecido como nicho pré-metastático, e é preparado antecipadamente pelo tumor primário através da liberação de fatores tumorais na forma de sinais que recrutam diversas células do sistema imunológico (Smith & Kang, 2013; Welch & Hurst, 2019).

Os nichos pré-metastáticos são locais que possuem matriz extracelular remodelada, alta permeabilidade vascular, desregulação imune e expressão de moléculas endoteliais que facilitam a adesão das CTD's ao local (Peinado *et al.*, 2017).

As células tumorais que falharam ao se adaptar e colonizar um determinado tecido, ou que sofreram imposição de sinais anti-proliferativos, podem entrar em estado de dormência, que pode durar semanas, meses e até anos (Lambert *et al.*, 2017). As micrometastases estão suscetíveis a este evento, uma vez que as taxas de apoptose se igualem à taxa de proliferação (Fares *et al.*, 2020). Adicionalmente, o desenvolvimento de microambientes de dormência também pode ocorrer. Os nichos de dormência são constituídos por células do tecido conjuntivo (fibroblastos, perícitos e células imunológicas) que liberam fatores estimuladores de quiescência em células tumorais que se disseminaram em microambientes pouco favoráveis ao seu crescimento (Peinado *et al.*, 2017).

A disseminação metastática de células cancerosas e consequente formação de novos tumores no hospedeiro é a principal causa da mortalidade relacionada ao câncer (Li *et al.*, 2019a; Liskova *et al.*, 2020; Meirson, 2020). Cerca de 90% dos pacientes vêm a óbito em decorrência de metástases (García-Román, 2013; Popper, 2020). Com exceção do câncer cerebral e câncer de pele basal, todos os cânceres, incluindo sarcomas, melanomas e malignidades hematológicas, têm a capacidade de metastatizar (Compton *et al.*, 2020).

2.5. Câncer de Pele: não-melanoma e melanoma

A pele é o maior órgão do corpo humano, possui funções de proteção contra o calor, luz, infecções, e auxilia no controle da temperatura corporal e armazenamento de água (Zhang *et al.*, 2020). O desenvolvimento do câncer de pele está entre as diversas complicações que podem acometer este órgão, e se não diagnosticado e tratado precocemente, pode comprometer a qualidade de vida e levar indivíduos a óbito (García-Montero, 2020; INCA, 2021a).

O câncer de pele é um dos mais comuns no mundo e o crescimento anormal das células que compõem a pele é o principal evento biológico que caracteriza a doença (Craythorne & Al-Niami, 2017; Skin Cancer Foundation, 2021).

Diversas causas podem contribuir para o seu surgimento, incluindo suscetibilidade a queimaduras, fatores fenotípicos (pele clara, olhos azuis, cabelos ruivos), genéticos (histórico familiar), doenças raras (*xeroderma pigmentosum*) e síndromes de GORLIN e de MUIR-TORRE (Lai *et al.*, 2018). Adicionalmente, exposição ao composto químico arsênico e imunossupressão são fatores relevantes,

porém a principal causa associada é a exposição cumulativa aos raios solares ultravioleta (Fahradyan *et al.*, 2017; Liu-Smith, 2017; Didona *et al.*, 2018).

Referente ao câncer de pele, duas categorias são existentes: câncer de pele não-melanoma e câncer de pele melanoma (Pacheco & Krolling, 2020). O câncer de pele do tipo não-melanoma ocupa posição de destaque entre os tipos mais comuns de câncer no mundo, tendo em vista sua colocação em quinto lugar no ano de 2018, apresentando mais de um milhão de casos e 65 mil mortes (Bray *et al.*, 2018). No Brasil, segundo dados do INCA., (2021a), foram constatados 2.616 mil óbitos em 2019, e estimados mais de 170 mil casos no ano de 2020.

O câncer de pele não-melanoma tem origem nos queratinócitos, células localizadas na camada granulosa e camada basal da epiderme (Maru *et al.*, 2014). Este tipo corresponde a 95 % dos casos de câncer de pele no mundo, possuem desenvolvimento lento, raramente são letais e são mais frequentes em partes do corpo comumente expostas ao sol, como orelhas, rosto, pescoço e ante-braços (Craythorne & Al-Niami, 2017; OMS, 2017). Seus tipos mais frequentes incluem o carcinoma basocelular e o carcinoma de células escamosas (Lai *et al.*, 2017).

Por outro lado, o melanoma é uma das formas mais agressivas do câncer de pele e uma das principais causas de mortalidade por câncer, tendo em vista seu alto potencial metastático (Leonardi *et al.*, 2018). Em 2018, mais de 287 mil casos e 60 mil mortes foram reportados (Bray *et al.*, 2018). De acordo com o INCA., (2021b), no Brasil, mais de 1,9 mil óbitos foram constatados em 2019 e mais de 8 mil casos foram estimados em 2020.

Este tipo de câncer tem origem nos melanócitos, células localizadas na camada basal da epiderme, e que produzem a melanina, substância que dá pigmentação a pele (Maru *et al.*, 2014; American Cancer Society, 2021a). Adicionalmente, o melanoma ainda pode ser classificado conforme sua apresentação, em cutâneo e não cutâneo (Tas *et al.*, 2011).

Melanomas cutâneos compreendem a maioria dos casos diagnosticados (91,2%) e são subdivididos em (I) melanoma expansivo superficial; crescimento lateral e posteriormente vertical (invasivo); (II) melanomas nodulares; lesões elevadas e verticais de rápido crescimento, geralmente de pigmentação azul ou preta; (III) melanoma lentiginoso; comum em idosos, cresce verticalmente, iniciando-se como pequenas máculas ou sardas, evolui com o tempo, torna-se assimétrico; e (IV) acral

lentiginoso; comum nas palmas do pés, mãos, regiões subungueais e mucosas (Schandedorf *et al.*, 2015; Carr *et al.*, 2019). Melanomas não cutâneos são incomuns e podem surgir em regiões oculares, genitais e nasais (McLaughlin *et al.*, 2005; Del Prete *et al.*, 2016).

A agressividade e letalidade dos melanomas podem ser atribuídas a presença de várias alterações genéticas (Miller, 2006; Luke *et al.*, 2017; My Cancer Genome, 2021a). A desregulação nos genes BRAF, NRAS, e NF1 que participam ativamente da via das MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), são alguns exemplos de alterações impulsoras no desenvolvimento do melanoma (Figura 13) (Jenkins & Fisher, 2020). O gene KIT que codifica o receptor tirosina quinase é outro exemplo, cuja ativação está associada com a proliferação e sobrevivência do melanoma através da ativação da via P13K/Akt (Leonardi *et al.*, 2018).

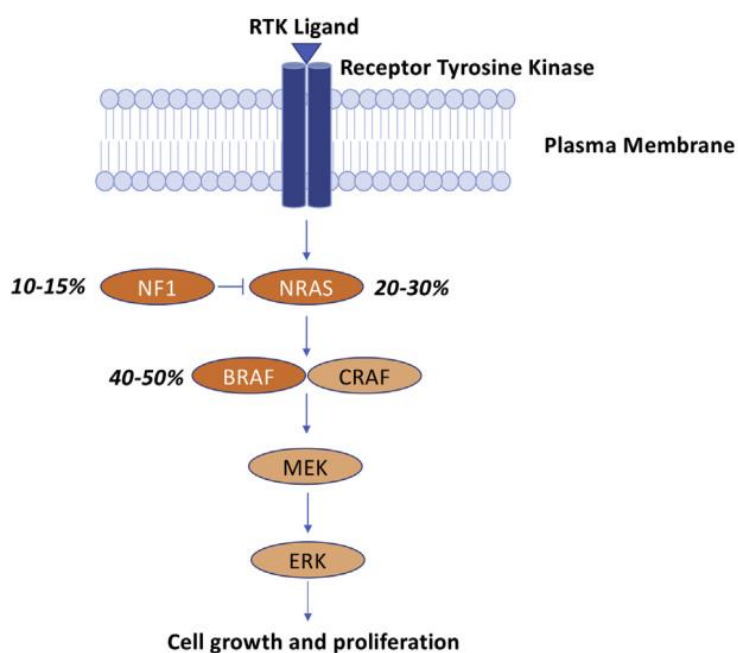


Figura 13. Desregulação da via de sinalização MAPK no melanoma. Fonte: Jenkins & Fisher, (2020).

A radiação ultravioleta (UVR) é o principal fator de risco para ambos os tipos de câncer de pele. No caso do tipo não melanoma, este fator advém principalmente da exposição cumulativa a UVR, enquanto a superexposição a UVR pode ser o fator desencadeante do tipo melanoma (Lindqvist *et al.*, 2022). A UVR pode promover danos ao DNA das células da epiderme de maneira direta ou indireta (Pfeifer *et al.*, 2020). A radiação UVB induz a formação de fotoprodutos como dímeros de ciclobutano pirimidina e pirimidina-pirimidona, podendo desencadear quebras na fita de DNA (Emanuelli *et al.*, 2022). A radiação UVA pode promover principalmente danos oxidativos, induzindo a formação de espécies reativas como o $^1\text{O}_2$, por meio de reações de fotossensibilização (Cadet *et al.*, 2015; Di Mascio *et al.*, 2019).

Neste sentido, alguns cuidados podem ser tomados em relação a prevenção e suspeita do surgimento do câncer de pele. Estes incluem, evitar exposição prolongada e desprotegida aos raios solares, utilizar protetores solares e a quimioprevenção (Wehner, 2018; Carr *et al.*, 2019; Fontana *et al.*, 2019).

A autoverificação no corpo utilizando os critérios ABCDE (A: assimetria, B: Bordas, C: cor, D: diâmetro, e E: evolução) do melanoma, podem auxiliar na prevenção e diagnóstico de possíveis complicações. (Figura 14) (Craythorne & Al-Niaml, 2017; Carr *et al.*, 2019).

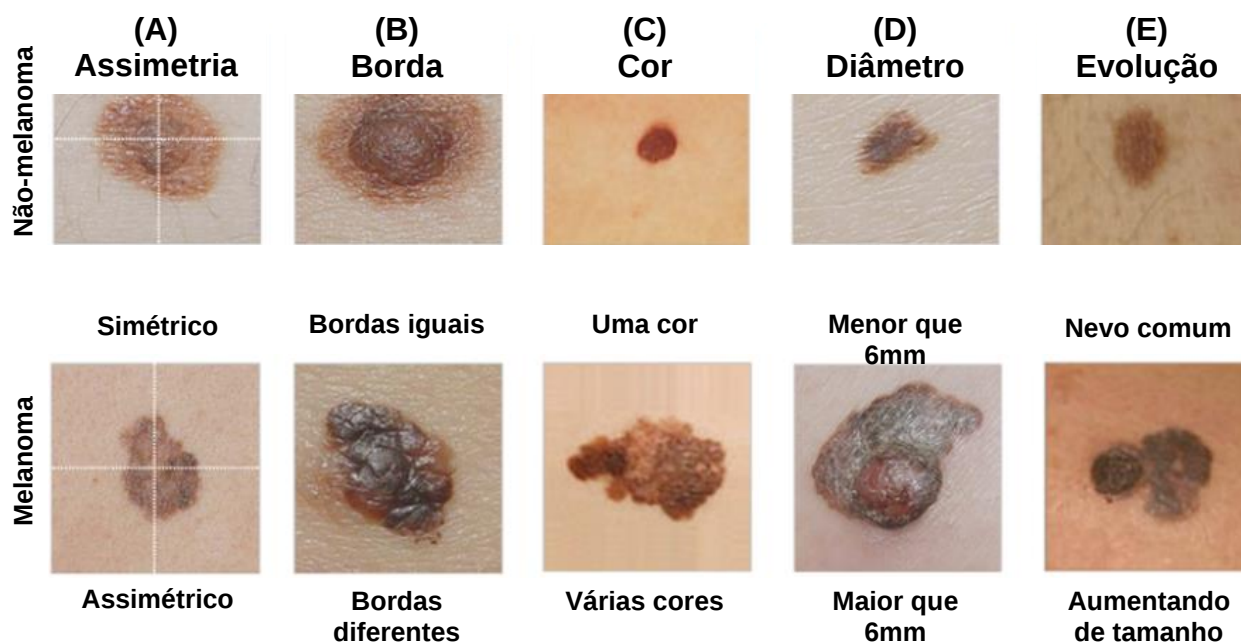


Figura 14. Os critérios ABCDE do melanoma. Fonte: Gajera *et al.*, 2022, (adaptado).

2.6. Leucemias

A medula óssea possui papel essencial na produção das células sanguíneas do nosso corpo (Johnson *et al.*, 2020). Os eritrócitos (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas (fragmentos celulares) são desenvolvidas neste tecido, a partir de células tronco hematopoiéticas (Figura 15) (Bain *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Uma das principais funções dos eritrócitos inclui a captação do oxigênio dos pulmões e seu transporte para os tecidos do organismo, os leucócitos são responsáveis pela defesa imunológica e as plaquetas possuem a função de coagulação sanguínea, essencial para a homeostase (Glenn & Armstrong, 2019; Bain *et al.*, 2021).

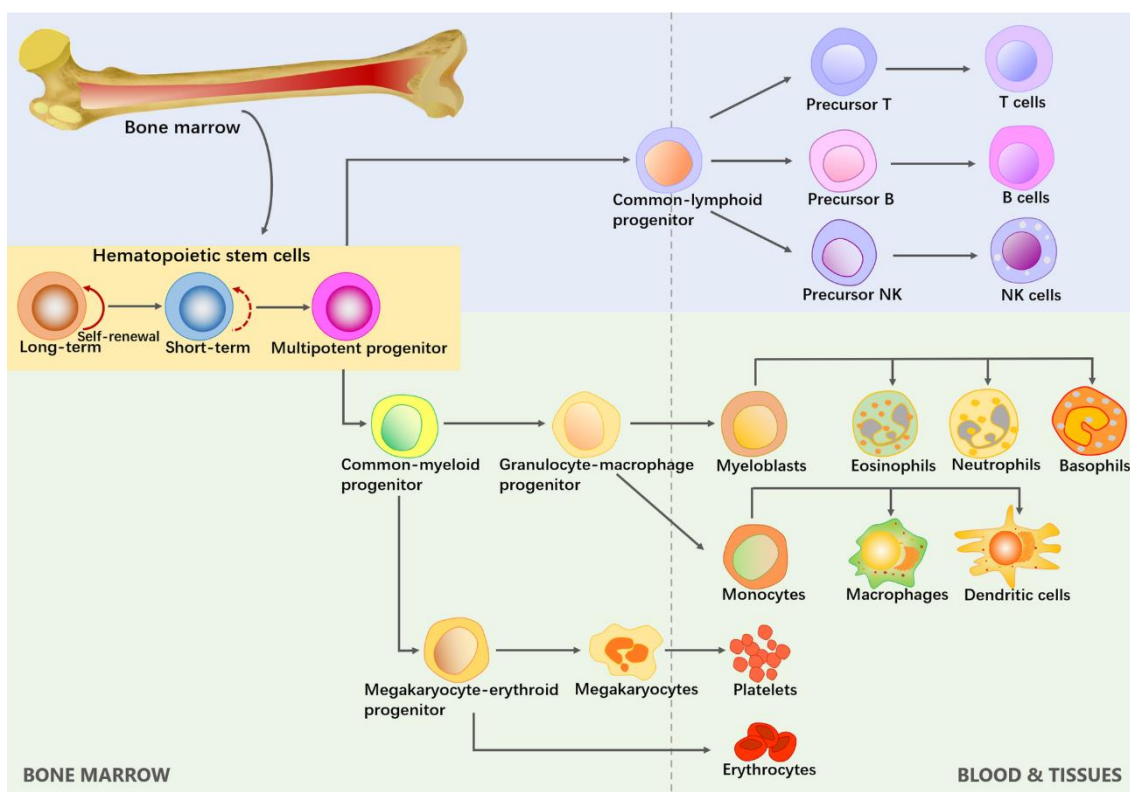


Figura 15. Produção de células sanguíneas a partir da diferenciação de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea. Fonte: Zhang *et al.*, (2019).

A produção de células sanguíneas em excesso configura um grupo de malignidades hematológicas conhecidas como leucemias (Yilmaz *et al.*, 2020; Méndez-Ferrer, 2020), um tipo de câncer hematológico que acomete as células presentes no tecido hematopoiético.

As leucemias se caracterizam pela proliferação desenfreada dos glóbulos brancos, em consequência de alterações genéticas promovidas em células tronco/progenitoras durante estágios de diferenciação e maturação (Long *et al.*, 2022). Muitas vezes, as células transformadas não conseguem sair do estágio inicial de desenvolvimento, permanecendo indiferenciadas e não funcionais (Nowak *et al.*, 2009).

As células transformadas podem se acumular na medula óssea ou no sangue periférico, prejudicando a produção e/ou inibindo a ação de outras células sanguíneas normais, eventos que desencadeiam diversos sinais da doença (Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016; Behrmann *et al.*, 2018). Os sintomas podem ser relacionados a (I) diminuição dos eritrócitos: ocasiona anemia, palpitação, falta de ar, fadiga e dor de cabeça; (II) redução dos glóbulos brancos: leva ao comprometimento das defesas imunológicas e torna o paciente suscetível a infecções recorrentes; e (III) a diminuição no número de plaquetas: promove o aparecimento de manchas roxas pelo corpo e sangramento no nariz e na região das gengivas (Davis *et al.*, 2014; Bernard *et al.*, 2017; INCA, 2021c). Outros sintomas incluem febre, suor noturno, dispneia e esplenomegalia (Jabbour & Kantarjian, 2018; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

No ano de 2018 foram estimados mais de 435 mil casos e mais de 309 mil mortes por leucemia no mundo (Bray *et al.*, 2018). No Brasil, segundo dados do INCA, (2021c), foram estimados mais de 10 mil casos de leucemia no ano de 2020 e 7,3 mil mortes no ano de 2019. As leucemias podem ser categorizadas baseando-se nos parâmetros de velocidade de evolução da doença: leucemias agudas (agravam-se rapidamente) e leucemias crônicas (agravam-se lentamente); e baseado no tipo de origem celular: leucemias linfoides (origem linfoide) e leucemias mieloides (origem mieloide), configurando quatro subtipos principais: Leucemia Linfoide Aguda (LLA); Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Linfoide Crônica (LLC) e Leucemia Mieloide Crônica (LMC) (Hao *et al.*, 2019).

A LLA é o tipo mais comum de leucemia em crianças (1-14 anos), correspondendo a 80 % dos casos (Rasool *et al.*, 2015; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Este tipo de leucemia pode se originar de um único precursor hematopoiético que afeta as linhagens de linfócitos B (85%), linfócitos T (10-15%) e células NK <1% (Fujita *et al.*, 2021). Em pacientes com LLA, mutações em genes codificadores de histonas (CREBBP, EP300), em genes relacionados a ativação da via de sinalização

RTK-RAS (FLT-3, NRAS, KRAS e PTPN11) e apoptose (TP53) são descritas (Malard & Mohty, 2020).

Em contraste, a LMA pode surgir em qualquer faixa etária, mas atinge principalmente adultos e idosos (Behrmann *et al.*, 2018; Shallis *et al.*, 2019; Yi *et al.*, 2020), sendo caracterizada pela expansão clonal de células precursoras de origem mieloide (eritroides, megacariocíticas e monocíticas) indiferenciadas (Rubnitz *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2012; Papaemmanuil *et al.*, 2016). Na LMA, rearranjos cromossômicos e diversas mutações também estão presentes, incluindo nos genes do receptor FLT3, de fatores de transcrição mieloide (RUNX1) e no gene do inibidor tumoral nucleofosmina (NPM1) (Döhner *et al.*, 2015). Adicionalmente, alterações genéticas em LMA podem se acumular com a idade (Saultz & Garzon, 2016).

As leucemias crônicas são responsáveis por 43% dos casos em todo o mundo e são caracterizadas por um acúmulo relativamente lento de células sanguíneas anormais, principalmente maduras (Elert, 2013). A LLC também é um tipo de câncer hematológico em que as células anormais são de origem linfóide (Delgado *et al.*, 2020). A maioria das pessoas diagnosticadas com a doença tem mais de 55 anos, afetando raramente crianças (INCA, 2021c). Deleções no cromossomo 13, mais especificamente no gene DLEU2 (supressão tumoral) estão presentes em 55% dos casos da doença, outras mutações ocorrem no gene ATM (resposta a danos ao DNA) e TP53 (apoptose) (Hallek, 2017; Chiorazzi *et al.*, 2021).

A LMC é caracterizada pelo crescimento descontrolado de células mieloides em diferentes estágios de maturação, evolui vagarosamente e acomete principalmente adultos (INCA, 2021c; Minciacchi *et al.*, 2021). A LMC é caracterizada por uma anomalia cromossômica que leva a formação do cromossomo Filadélfia (95 % dos casos), através da fusão do gene ABL1 presente no cromossomo 9 com o gene da região BCR do cromossomo 22 (Jabbour & Kantarjian, 2018; Losson *et al.*, 2020) (Figura 16).

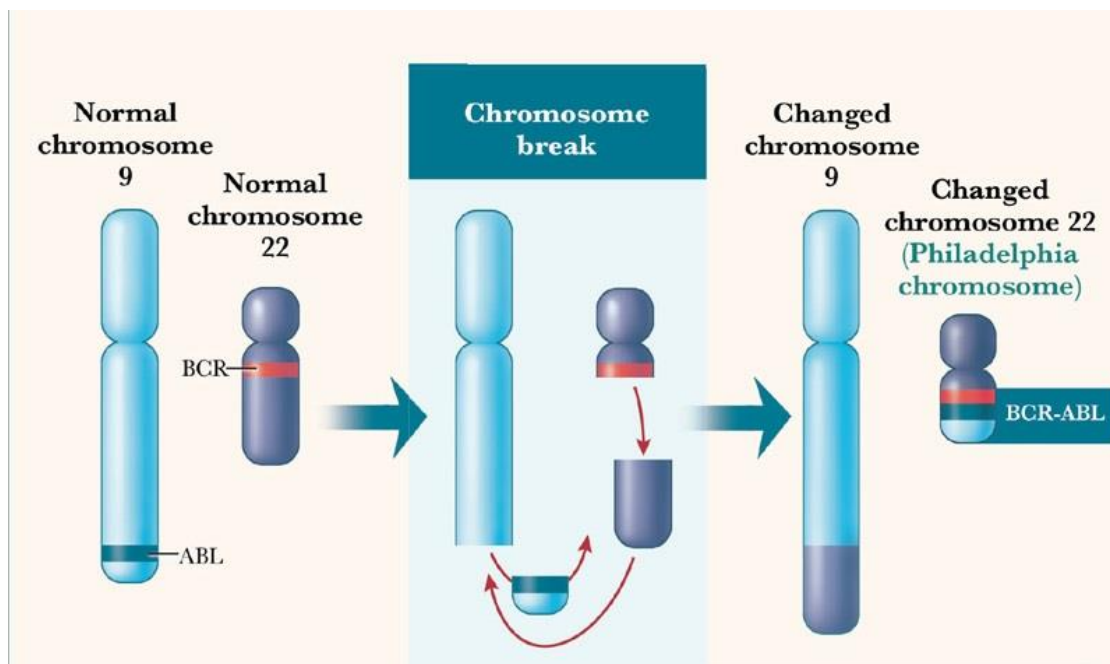


Figura 16. Formação do cromossomo Filadélfia. Fonte: The Canadian CML Network, (2021).

A formação do cromossomo Filadélfia promove a expressão da oncoproteína de fusão BCR-ABL1, que por sua vez, possui atividade tirosina quinase constitutiva (Sharf *et al.*, 2020; Vetrie *et al.*, 2020), podendo levar a ativação de vias de sinalização a jusante, ocasionando: (I) modificação na adesão de células do estroma; (II) promoção de sobrevivência; e (III) inibição da apoptose, transformação celular e aquisição de capacidade de auto-renovação (Minciacchi *et al.*, 2021). Adicionalmente, outras alterações genéticas frequentes em casos de LMC são evidenciadas nos genes RUNX1, FLT3 e ASXL1 (remodelação da cromatina) (Ernst *et al.*, 2018; MedlinePlus, 2018; Awad *et al.*, 2020; My Cancer Genome, 2021b).

Existem vários fatores de risco que aumentam as chances de uma pessoa desenvolver algum tipo de leucemia. Dentre estes, estão (I) idade: onde crianças são mais propensas a ter LLA, enquanto pessoas mais velhas são mais propensas a desenvolver LMA e LLC; (II) gênero: homens possuem maiores chances de desenvolver leucemias que as mulheres; (III) raça: leucemias são mais comuns em pessoas brancas, (IV) vírus: infecções por HTLV-1 (vírus linfotrópico de células-T humanas) estão associadas com LLA; e (V) exposição à radiação e produtos químicos, histórico familiar e síndromes genéticas são fatores gerais associados ao desenvolvimento de leucemias (Malard & Mohty, 2020; American Cancer Society, 2021b,c,d; Tebbi, 2021).

Frente a presença dos sintomas mencionados, o diagnóstico de leucemia pode ser realizado. O principal método é o hemograma, e para confirmação é realizado o mielograma, caracterizado pela punção e coleta do material biológico presente na medula óssea do paciente, com finalidade de examinar a morfologia, a presença de mutações, os cromossomos e o fenótipo das células hematopoiéticas (INCA, 2021c). Algumas das técnicas utilizadas no diagnóstico incluem a citometria de fluxo (imunofenotipagem), RT-PCR (análise molecular do DNA) e Fluorescence *in situ* hybridization (Hibridização *in situ* por fluorescência) (FISH) para análise cromossomal (detecção da presença do cromossomo Filadélfia) (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017; Javed *et al.*, 2020).

2.7. Tratamentos oncológicos

As opções atualmente disponíveis para o tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de células-tronco hematopoiéticas, imunoterapia e terapia alvo. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cancerologia (SBC, 2024), o tratamento do câncer pode ser realizado de maneira combinada, no entanto, a melhor opção de tratamento deve ser definida com base no tipo de câncer e de acordo com o estágio da doença.

A cirurgia é um procedimento realizado para remover um tecido com grande volume de células cancerígenas, denominado tumor. Neste tratamento, pode ser realizado um único corte ou vários (cirurgia minimamente invasiva) para retirada do tumor, e dependendo de fatores como localização no corpo e tamanho, o tumor pode ser removido sem trazer riscos desnecessários aos tecidos saudáveis do paciente (Abbas & Rehman, 2018). O procedimento cirúrgico pode ser realizado para fins preventivos, diagnóstico, determinar o estágio do tumor e para fins paliativos (casos de câncer avançado) (American Cancer Society, 2019a).

A radioterapia utiliza altas doses de radiação para matar ou retardar o crescimento de células cancerosas ao danificar seu DNA (National Cancer Institute, 2019a). Este tratamento deve ser capaz de matar células cancerosas ao máximo, dentro dos limites em que tecidos saudáveis adjacentes possam tolerar as lesões por radiação (Chen & Kuo, 2017). Na maioria dos pacientes, a radioterapia é aplicada em uma parte pequena e bem definida do corpo, tendo em vista que um tecido normal, quando exposto, pode ser afetado e sofrer efeitos tóxicos (Ruysscher *et al.*, 2019).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas envolve a retirada de células-tronco saudáveis do sangue periférico, células do sangue do cordão umbilical ou da medula óssea de uma pessoa e transferi-las para outra (National Cancer Institute, 2015). O tratamento pode ocorrer por meio de transplante autólogo (células-tronco coletadas do próprio paciente são congeladas, armazenadas e infundidas após tratamentos com radio ou quimioterapia) ou pelo transplante alogênico (células-tronco coletadas de um doador compatível) (Cancer Treatment Centers of America, 2021a).

Em ambos os tipos de transplantes, um regime de condicionamento deve ser seguido, como o uso intensivo de quimioterapia para eliminar células cancerosas ao máximo (autólogo) ou supressão imunológica para receber células-tronco de outro doador (alogênico) (Copelan *et al.*, 2006; Wingard *et al.*, 2010). O tratamento por transplante possui duas finalidades terapêuticas: (I) restaurar a capacidade de produção de células-tronco em pacientes que tiveram suas células mortas após sessões com altas doses de radioterapia ou quimioterapia; e (II) ação direta sobre o câncer, que ocorre quando os glóbulos brancos do doador, atacam qualquer célula cancerosa no corpo do paciente (efeito enxerto versus tumor) (Hatzimichael & Tuthill, 2010; National Cancer Institute, 2015). Adicionalmente, este tratamento pode desempenhar um papel importante em casos de leucemia e outras doenças hematológicas (Dickinson *et al.*, 2017).

Durante os últimos anos, a imunoterapia foi um dos principais avanços no tratamento do câncer. Essa modalidade terapêutica possui a finalidade de estimular o sistema imunológico para reativar a resposta imune antitumoral e superar as vias que levam ao escape da morte celular (Kennedy & Salama, 2020). Atualmente, diferentes tipos de imunoterapia são existentes e podem ser utilizados, tais como os inibidores de *checkpoint* imunológico, terapia de transferência de células T, vacinas contra câncer e anticorpos monoclonais, que são capazes de marcar células cancerosas para facilitar a detecção e destruição pelo sistema imune (National Cancer Institute, 2019b; TAN *et al.*, 2020; Cancer Treatment Centers of America; 2021b). De maneira geral, ativar o sistema imune para eliminar tumores em pacientes é o efeito desejado, no entanto, o uso das imunoterapias é limitado, tendo em vista que efeitos adversos autoimunes podem ocorrer e promover danos inflamatórios em tecidos saudáveis (Riley *et al.*, 2019; Esfahani *et al.*, 2020).

Outra modalidade de tratamento conhecida é a terapia alvo, que visa a administração de drogas que atuam em alvos moleculares, como genes e proteínas que são específicas para as células cancerosas ou para o ambiente do tecido que promove o crescimento do tumor (Padma, 2015). Uma vez que estes alvos são atingidos, vias específicas relacionadas à carcinogênese e ao crescimento do tumor são bloqueadas, induzindo apoptose, bloqueio de enzimas e receptores de fator de crescimento envolvidos na proliferação, metástases, regulação do sistema imune e modificação da função de proteínas que regulam a expressão de genes (Joo *et al.*, 2013; Ke & Shen, 2017; Lee *et al.*, 2018b). Na terapia alvo são utilizadas (I) pequenas moléculas que adentram facilmente em células tumorais, que se ligam seletivamente a alvos moleculares e interferem em vias de sinalização e também (II) anticorpos monoclonais que marcam alvos na superfície celular, atuando como inibidores de tirosina quinases ou transportando fármacos citotóxicos (Joo *et al.*, 2013; Falzone *et al.*, 2018). Assim como outros tratamentos, a terapia alvo pode desencadear efeitos adversos (Brown *et al.*, 2016).

A quimioterapia afeta a evolução do tumor, suprimindo sua capacidade de divisão e auxiliando a apoptose, utilizando agentes denominados quimioterápicos, que atuam promovendo morte celular de células tumorais, através do contato direto com o DNA ou proteínas-chave necessárias para a divisão celular (Abbas & Rehman, 2018; Dickens & Ahmed, 2018). Dependendo de sua origem, os quimioterápicos podem ser divididos em duas classes: derivados de produtos naturais ou de origem sintética (Bukowski *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020; Dehelean *et al.*, 2021). O mecanismo de ação é outro fator que diferencia os quimioterápicos, sendo classificados em agentes alquilantes, inibidores de topoisomerases, antimetabólitos, inibidores mitóticos e antibióticos antitumorais (Dickens & Ahmed, 2018; American Cancer Society, 2019b).

2.7.1. Quimioterápicos: Mecanismos de ação e obstáculos

O avanço nas áreas da biologia celular, molecular e imunologia contribuíram para revolucionar as terapias direcionadas ao câncer, através do advento da terapia alvo e imunoterapia. Porém, tais tratamentos ainda possuem custos demasiadamente elevados (Asbestos, 2021), um dos fatores que tornam difícil o uso destas terapias por grupos de pessoas com menor poder aquisitivo. Dentre as diferentes terapias

existentes, a quimioterapia ainda se destaca como a opção mais comum de tratamento do câncer (Bukowski *et al.*, 2020).

Agentes quimioterápicos são capazes de impedir a progressão de um câncer, uma vez que possuem vários alvos e mecanismos de ação (Zajęczkowska *et al.*, 2019). Dentre as diferentes classes citadas anteriormente estão:

(I) Agentes alquilantes: reagem com o DNA, adicionam radicais alquila, promovendo quebras e ligações cruzadas no DNA e impedem seu reparo;

(II) Antimetabólitos: substituem as bases de RNA e DNA e impedem sua síntese (Pan *et al.*, 2016);

(III) Inibidores de topoisomerasas: interferem na atividade de enzimas que atuam no desenovelamento do DNA;

(IV) Inibidores mitóticos: interrompem a divisão celular durante a mitose, através da interação com as tubulinas, impedindo a formação de microtúbulos ou estabilizam e impedem sua quebra; (Kim *et al.*, 2016; Martino *et al.*, 2018);

(V) Antibióticos antitumorais: podem ligar-se ao DNA e interferir com a atividade das enzimas de replicação, induzir a formação de radicais livres e ocasionar parada do ciclo celular (Bukowski *et al.*, 2020; Mollael *et al.*, 2021).

Medicamentos como a cisplatina (alquilante), vimblastina (inibidor de fuso mitótico) e doxorrubicina (antibiótico antitumoral) são alguns exemplos de agentes quimioterápicos que promovem a morte por apoptose (Pan *et al.*, 2016; Zajęczkowska *et al.*, 2019; Bukowski *et al.*, 2020).

A apoptose é um mecanismo de morte celular intrínseco, altamente regulado e seguro, conhecido como morte celular programada (Sepúlveda *et al.*, 2019; Wattanathamsan *et al.*, 2019). Possui papel essencial na homeostase do nosso organismo, eliminando células que sofreram danos genéticos irreversíveis durante o desenvolvimento, erradicando agentes invasores em respostas imunológicas e participando do processo de senescência (Argüelles *et al.*, 2019; D'arcy *et al.*, 2019; Brokatzky *et al.*, 2020).

Células que entram em apoptose passam por mudanças estruturais e bioquímicas, que incluem condensação da cromatina, encolhimento citoplasmático, fragmentação nuclear e formação de “blebbings” da membrana plasmática (Wattanathamsan *et al.*, 2019; Obeng *et al.*, 2020). A etapa final deste processo ocorre quando os corpos apoptóticos formados são engolfados por macrófagos (Czabotar *et*

al., 2014). Eventos que marcam a apoptose como um processo biológico organizado e não inflamatório (Opdenbosch & Lamkanfi, 2019).

As particularidades desta modalidade de morte celular programada são garantidas devido as cascatas de sinalização onde participam diferentes tipos de moléculas sinalizadoras e proteínas efetoras. A ativação de apoptose pode ser induzida pela via extrínseca, por meio de receptores de morte ou através da via intrínseca (via mitocondrial) (Argüelles *et al.*, 2019). Geralmente, o processo apoptótico é dependente da ativação de proteases denominadas caspases, divididas em iniciadoras (8, 9 e 10), e executoras (3 e 7) que participam de ambas as vias (Suhaili *et al.*, 2017; D'arcy *et al.*, 2019) (Figura 17). Além disso, AIF (*apoptosis-inducing-factor*) e EndoG (*endonuclease G*) são proteínas que também participam do processo de apoptose via mitocondrial, em etapas posteriores, uma vez que a célula decide morrer (Elmore, 2007).

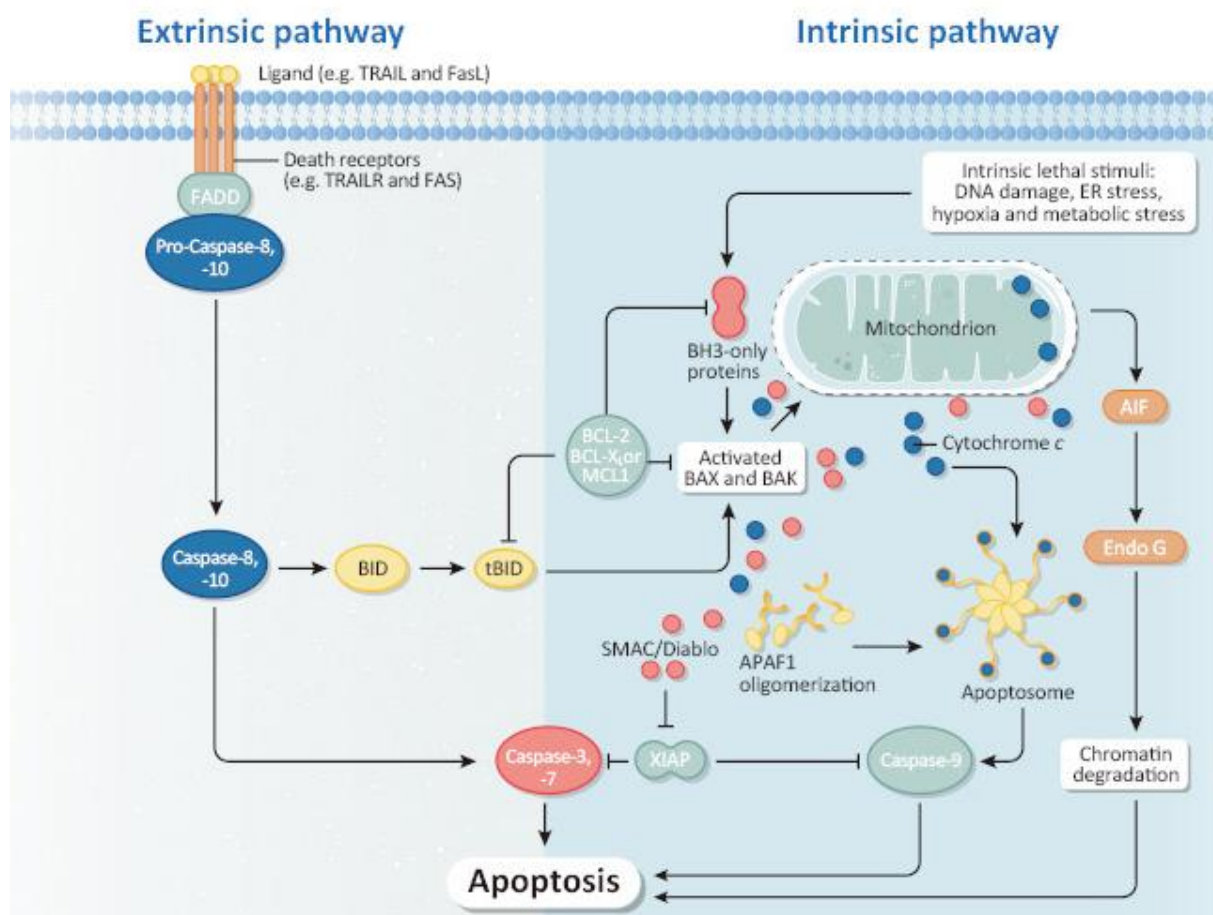


Figura 17. Representação esquemática da morte celular programada (apoptose) e suas vias extrínseca e intrínseca. Fonte: GeneTex, (2021).

A via extrínseca é iniciada por meio de moléculas sinalizadoras, como Fas ligante (FasL), fator de necrose tumoral (TNF- α) ou TNF-ligante indutor relacionado a apoptose (TRAIL), que se ligam aos seus respectivos receptores de morte, como Fas, TNFR-1 (receptor 1 de TNF), DDR4 ou DDR5 (Schwabe & Luede, 2018; Li *et al.*, 2020; Arguello & Haisma, 2021). Após esta interação, os receptores recrutam o FADD, uma proteína adaptadora que recruta as procaspases (forma inativa) 8 e 10 para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC), processo que leva a autoativação das caspases-8 e 10 (Green *et al.*, 2019; Boraldi *et al.*, 2021; Obeng *et al.*, 2020). As caspases-8 ou 10 quando ativas, promovem a ativação das procaspases-3 e 7 em caspases-3 e 7, as proteases executoras da apoptose (Yang *et al.*, 2015).

A via intrínseca da apoptose é dependente de fatores que são liberados pela mitocôndria durante a permeabilização de sua membrana externa (Kalkavan & Green, 2018; D'arcy *et al.*, 2019). A regulação deste evento, é feita por proteínas da família Bcl-2, divididas em anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl) e pró-apoptóticas (Bad, Bax, Bak e Bid), sendo que sua interação, bem como os níveis de ambas as classes de proteínas, que determinará ou não a ativação de apoptose via mitocondrial (Abate *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

A permeabilização da membrana mitocondrial pode ocorrer devido a uma variedade de estímulos considerados apoptóticos, incluindo hipóxia, estresse oxidativo, privação de citocinas, hormônios e fatores de crescimento, uso de agentes quimioterápicos, infecções virais e danos ao DNA (Loreto *et al.*, 2014; Suhaili *et al.*, 2017; D'arcy *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019). Tais estímulos agem como um gatilho, ativando e aumentando a expressão das proteínas pró-apoptóticas, que por sua vez inibirão as proteínas anti-apoptóticas (Heitzer *et al.*, 2020), levando a formação de poros e permeabilização da membrana mitocondrial pela ação das proteínas Bad e Bax (Wyllie, 2010; Kalkavan & Green, 2018).

A abertura dos poros na membrana mitocondrial desencadeia a liberação de proteínas do espaço intermembranas da mitocôndria para o citosol, como o citocromo c e SMAC (Pfeffer & Singh, 2018). O citocromo c liga-se ao fator ativador de protease apoptótica 1 (APAF), para formar o complexo apoptossomo, que recruta e ativa a caspase-9, que por sua vez ativa as caspases-3 e 7 (Arguello & Haisma, 2021). Ao mesmo tempo, SMAC bloqueia a ação inibitória do XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) sobre as caspases-3 e 7 (Green, 2019). A caspase-3 cliva a

proteína PARP (*poly-ADP-ribose-polymerase*) impedindo que atue no reparo do DNA (Vo *et al.*, 2021), enquanto a caspase-7 é responsável pelo desprendimento de células apoptóticas (Brentnall *et al.*, 2013). Além disso, as caspases-3 e 7 são responsáveis por clivar vários substratos como proteínas do citoesqueleto e nucleares, resultando na apoptose e no surgimento de suas características, como a exposição de fosfatidilserinas, condensação nuclear, “blebbings” da membrana e fragmentação do DNA (Yang *et al.*, 2015; Pfeffer & Singh, 2018).

Adicionalmente, as células podem entrar em um processo de morte similar a apoptose e sem ativação de caspases (apoptose independente de caspases). Em casos de despolarização da membrana mitocondrial, AIF pode ser capaz de promover a condensação da cromatina e fragmentar o DNA da célula, e em casos de despolarização da membrana mitocondrial e/ou disfunção de caspases, EndoG pode ser capaz de degradar o DNA e RNA, resultando em morte celular (Schwab, 2017).

A apoptose não é a única modalidade de morte celular que pode ser promovida por agentes quimioterápicos, sendo assim, alguns quimioterápicos são capazes de desencadear a morte celular por necrose (Ricci & Zhong, 2006; Zhang *et al.*, 2014). Diferente da apoptose, a necrose é uma morte celular não regulada e independente de energia, promovida por estímulos físico-químicos muito severos, incluindo mudanças abruptas de pH, temperatura, pressão osmótica, desequilíbrio no fluxo de cálcio e na manutenção dos níveis ERO, infecções, altas doses de radiação, asfixia, choques elétricos e toxinas (Yang *et al.*, 2015; D’arcy *et al.*, 2019; Wattanathamsan., 2019; Nirmala & Lopus, 2020).

Durante a necrose, os danos são irreversíveis e os estímulos danificam gravemente as células, comprometendo suas funções (Miller & Zachary, 2017). Neste processo, existem dois principais mecanismos que levam a destruição celular: (I) perda da integridade da membrana celular, que permite o influxo de íons extracelulares para dentro da célula e (II) rompimento da membrana lisossomal, que leva à liberação de enzimas proteolíticas no citoplasma, como proteases, RNAase, DNAases e fosfatases (Khalid & Azimpouran, 2021). Estes processos resultam em inchaço das organelas, aumento do volume celular, digestão da cromatina, hidrólise do DNA, lise celular, vazamento de constituintes citoplasmáticos para o meio extracelular e ativação de cascatas inflamatórias (Orrenius *et al.*, 2015; D’arcy *et al.*, 2019).

A necrose atua independente da ativação de caspases e não segue vias ordenadas de transdução de sinal, no entanto, estudos já revelaram uma forma regulada de necrose, a necroptose (Nirmala & Lopus, 2020; Khalid & Azimpouran, 2021). Este é um tipo de morte celular regulada, que apresenta morfologia necrótica e compartilha de vias de sinalização com a apoptose (Chen *et al.*, 2018). Pode ser ativada através de receptores de morte celular como o TNFR-1 e 2, Fas, além de receptores do tipo Toll-like (TLR) 3 e 4 e por receptores de interferon (IFNR) (Yang *et al.*, 2015; Sauler *et al.*, 2019; Khoury *et al.*, 2020). Estímulos que se ligam a estes receptores, como TNF- α , FasL, TRAIL, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas virais podem promover a necroptose (Hanson *et al.*, 2016; Orzalli & Kagan, 2017).

A morte celular necroptótica pode ocorrer em decorrência de lesões químicas, mecânicas, inflamações e infecções (Khoury *et al.*, 2020), podendo ser ativada em situações em que uma morte celular específica, como a apoptose, falha ou é evitada (Schwabe & Luedde, 2018). Em particular, a inibição da caspase-8 é importante para redirecionar a morte apoptótica para a morte necroptótica (Miller & Zachary, 2017). Com a caspase-8 inibida, o mecanismo necroptótico é desencadeado, onde RIPK1 (*receptor interacting protein kinase 1*) em sua forma ativa, se liga a RIPK3 (*receptor interacting protein kinase 3*), para formação de um complexo denominado necrossomo, promovendo a ativação de RIPK3 que recruta e fosforila o MLKL (*lineage kinase domain-like protein*) (Chen *et al.*, 2019; Green, 2019).

Uma vez fosforilado, oligômeros de MLKL formados, se translocam para membrana plasmática e promovem a perda de sua integridade (D'arcy *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2019). A morte necroptótica ocorre pela formação de poros, que permite o influxo de íons, inchaço celular e lise da membrana (Bertheloot *et al.*, 2021) (Figura 18).

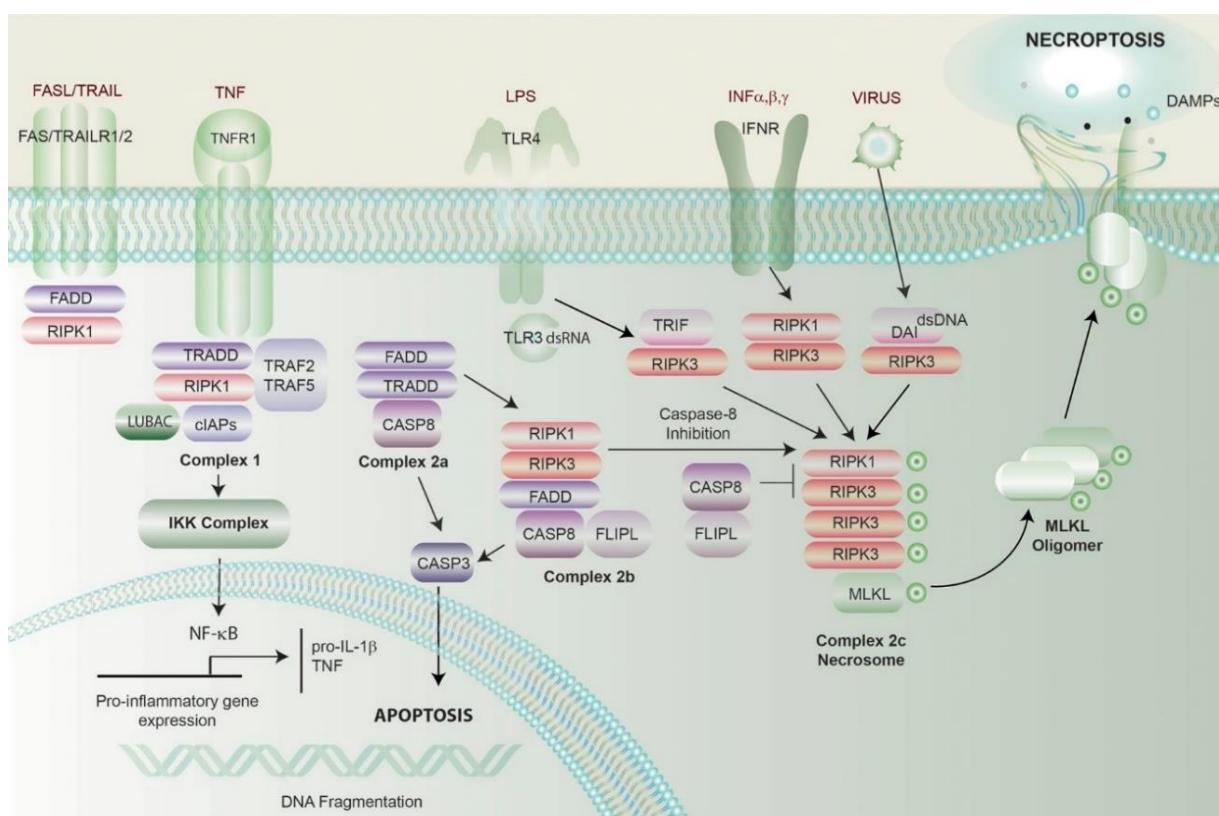


Figura 18. Representação esquemática das vias envolvidas no mecanismo de morte celular por necroptose. Fonte: Choi *et al.*, (2019).

Moléculas liberadas durante infecções virais e reconhecidas pelo DNA-dependent activator of interferon (DAI), podem ativar RIPK3 diretamente e mediar a necroptose (Orzalli & Kagan, 2017; Sauler *et al.*, 2019). Adicionalmente, alguns fármacos quimioterápicos como o etoposídeo (Tenev *et al.*, 2011) e a cisplatina (Xu *et al.*, 2017a) podem induzir a morte necroptótica dependente da ativação de RIPK1/RIPK3.

Além das modalidades de morte apresentadas até o momento, a apoptose tardia, também conhecida como necrose secundária (Gregory & Devitt, 2004; Sachet *et al.*, 2017), tem sido outro perfil de morte evidenciado no uso de agentes quimioterápicos (Zhang *et al.*, 2018a). Este tipo de morte apresenta características morfológicas e bioquímicas da apoptose e da necrose (Silva *et al.*, 2010), e acontece devido à ausência ou falha da etapa da fagocitose de células apoptóticas (Sachet *et al.*, 2017). Células apoptóticas quando não são removidas pelo processo de fagocitose, clivam e ativam a proteína DFN5 através da caspase-3, levando a formação de fragmentos de DFN5 N-terminais, que formam poros na membrana e

promovem sua permeabilização, induzindo a morte por necrose secundária (Rogers *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018a).

Como destacado, agentes quimioterápicos podem atuar por diferentes mecanismos de ação, promovendo o bloqueio da proliferação descontrolada e/ou eliminando células cancerígenas por diferentes modalidades de morte celular, em especial a apoptose. Estas, são as características positivas mais importantes dos compostos administrados como principal tratamento frente a diversos tipos de câncer. No entanto, os quimioterápicos não são capazes de diferenciar células normais de células cancerosas, promovendo toxicidade para ambos os tipos celulares no organismo (Pfeffer & Singh *et al.*, 2018; Mollaei *et al.*, 2021).

Infelizmente, a não seletividade dos quimioterápicos destaca um dos seus principais pontos negativos. A citotoxicidade dos quimioterápicos em células saudáveis pode promover redução da qualidade de vida aos pacientes (Iwamoto, 2013; Estanqueiro *et al.*, 2015). O surgimento de efeitos adversos são comuns, e podem incluir febre, náuseas, vômitos, mucosite oral, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, hepatotoxicidade, imunossupressão e alopecia (Santabarbara *et al.*, 2015; Krzyzanowska *et al.*, 2016; Nangia *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018b; Sardeli *et al.*, 2020). Estes, são fatores que podem levar a redução gradual das sessões de quimioterapia e até mesmo sua interrupção, podendo limitar sua eficácia (Zajęczkowska *et al.*, 2019).

Outro fator limitante que surgiu como um dos principais entraves é a quimiorresistência. Termo que descreve a capacidade de células cancerosas de evadir ou resistir a presença de quimioterápicos (Yeldag *et al.*, 2018). A resistência pode ser classificada em primária (ocorre antes do tratamento), ou adquirida (desenvolve-se após início do tratamento) (Pan *et al.*, 2016). Além disso, pode ocorrer o surgimento de células que tem resistência a múltiplas drogas/*multidrug resistance* (MDR). A MDR é caracterizada pela resistência celular a uma grande variedade de agentes quimioterápicos estruturalmente não relacionados com diversos mecanismos de ação (Reis *et al.*, 2020).

Em células cancerígenas a resistência a quimioterápicos pode ser atribuída a vários mecanismos, como efluxo de drogas (relacionado a proteínas de membrana transportadoras), vias de sinalização apoptóticas (resistência a danos e aumento do reparo do DNA, hiperativação de topoisomerases), metabolismo elevado de

xenobióticos (ativação de sistemas de detoxificação), mudanças nos alvos das drogas e fatores genéticos (mutações genéticas e alterações epigenéticas) (Li *et al.*, 2017; Bukowski *et al.*, 2020).

A resistência a múltiplas drogas está entre os principais desafios para o sucesso da quimioterapia, sendo a principal causa de falha do tratamento e responsável pelo aumento da mortalidade associada ao câncer (Li *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2020). Para superar os obstáculos deste atual tratamento, a busca por novos agentes anticâncer que possam atuar com maior eficácia e/ou com a ausência ou redução de efeitos adversos é imprescindível para a saúde humana.

Uma alternativa são os produtos naturais, conhecidos como uma fonte imensurável de novas moléculas ativas. Fato que possibilita a descoberta ou desenvolvimento de medicamentos promissores para uma variedade de doenças, incluindo o câncer (Dehelean *et al.*, 2021).

2.8. Produtos naturais

O uso de produtos naturais pelos seres humanos remonta há milênios (Bernardini *et al.*, 2018). Para atender suas necessidades básicas de sobrevivência, os seres humanos recorreram a natureza, para obtenção de alimentos, abrigo, recursos para confecção de vestimentas, meios de transporte e medicamentos (Cragg & Newman, 2001; Jamshidi-Kia, 2018). Um produto natural, pode ser qualquer produto produzido por um organismo (Abozenadah *et al.*, 2017; Sorokina & Steinbeck, 2020). Podem ser originários de plantas, animais e micro-organismos (bactérias e fungos), presentes em ambientes terrestres e marinhos (Katz & Baltz, 2016; Newman & Cragg, 2017).

No decorrer da história, os produtos naturais foram fundamentais para tratar várias doenças, contribuindo significativamente para a medicina e para a saúde humana (Partridge *et al.*, 2016; Ong & Tan, 2020). Os primeiros registros do uso destes produtos, datam de civilizações muito antigas. Em 5.500 a.C no Egito antigo, utilizavam o mel como fluído de embalsamento e curativo para feridas (Kuropatnicki *et al.*, 2018). Há 2600 a.C, na Mesopotâmia, foram constatados registros do uso de óleos de espécies de plantas como Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), Cipreste (*Cupressus sempervirens*) e de suco de papoula (*Papaver somniferum*), dos quais são utilizados até hoje no tratamento de tosses, resfriados e inflamações (Cragg & Newman, 2013).

Alguns exemplos que marcaram a história do uso dos produtos naturais foram a morfina (1803), substância extraída da planta *Papaver somniferum* (Dias *et al.*, 2012) e a penicilina (1929), antibiótico descoberto e isolado do fungo *Penicillium* por Alexander Fleming (Mohr, 2016). Atualmente, a pesquisa envolvendo os produtos naturais e suas possíveis aplicações continua em todo mundo. A enorme diversidade estrutural e química dos produtos naturais, consideradas únicas, continuam a inspirar novas descobertas de compostos promissores em química, biologia e medicina (Dias *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2015).

Os produtos naturais e seus derivados têm sido avaliados no tratamento de doenças inflamatórias, infecciosas, metabólicas, neurológicas, imunológicas, cardiovasculares e câncer (Butler *et al.*, 2014), e nas últimas décadas, muitos estudos relataram o efeito protetor dos produtos naturais e de seus compostos bioativos (Sairazi & Sirajudeen, 2020). Assim, o potencial biológico dos produtos naturais tem sido extensivamente aplicado na indústria farmacêutica, na área de doenças inflamatórias, infecções virais, processos oxidativos e câncer (Antonio *et al.*, 2020). Na área do câncer, dos 321 fármacos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) entre 1946 – 2019, 168 (52,3 %) são provenientes ou derivados de produtos naturais (Figura 19) (Newman & Cragg, 2020).

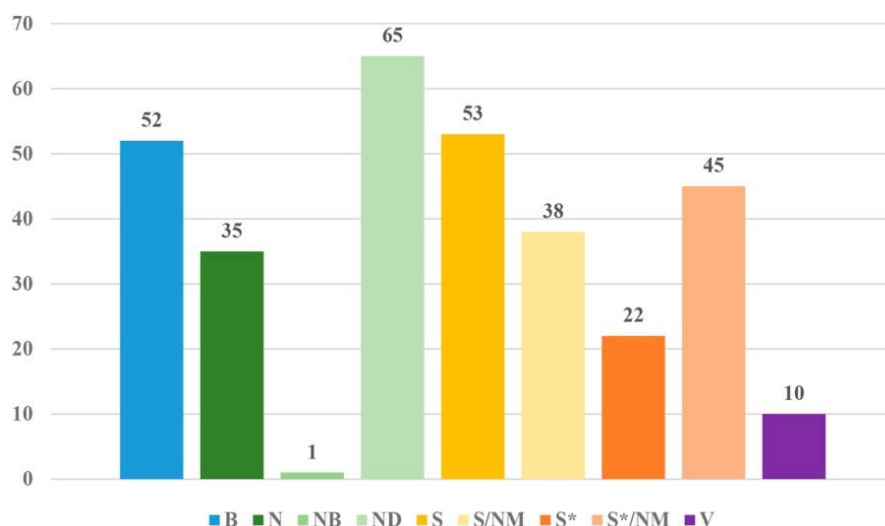


Figura 19. Fármacos anticâncer aprovados entre 1949 – 30/09/2019, n = 321. Macromolécula biológica (B), produto natural inalterado (N), droga botânica (NB), derivado de produto natural (ND), droga sintética (S), mímicos de produtos naturais (NM), droga sintética com farmacóforo de produto natural (S*), vacinas (V). Fonte: Newman & Cragg., (2020).

Dentre os primeiros exemplos de fármacos quimioterápicos derivados de produtos naturais e aprovadas para uso clínico, estão os alcaloides da Vinca (*Cataranthus roseus*), Vincristina e Vimblastina (Arora & Menezes, 2021), e também o Paclitaxel, diterpeno originalmente isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Bernabeu *et al.*, 2017). Apesar do desenvolvimento de importantes agentes quimioterápicos derivados ou inspirados em produtos naturais, é de conhecimento global as suas desvantagens. A citotoxicidade não seletiva e a possibilidade de quimioresistência são entraves que estimulam o desenvolvimento de novos medicamentos através da busca e uso de bioativos de produtos naturais, uma alternativa com potencial de promover a otimização e/ou inovação, para eliminar os principais obstáculos da quimioterapia e/ou integrar outros tratamentos.

Em relação aos produtos naturais avaliados farmacologicamente, existe uma variedade de estudos que demonstram o potencial na redução de reações adversas promovidas por agentes quimioterápicos, como mucosite oral, gastrotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, injúria ao sistema hematopoiético, cardiotoxicidade e neurotoxicidade (Zhang *et al.*, 2018b). Os efeitos e mecanismos de ação são provenientes de diferentes compostos derivados de produtos naturais (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos de produtos naturais analisados frente a redução de efeitos adversos da quimioterapia.

Compostos	Fonte	Efeito/Mecanismo	Modelo experimental	Redução Efeito adverso	Referência
Curcumina	Açafrão-da-terra (<i>Curcuma longa</i>)	Antioxidante, anti-inflamatório, anticâncer. Redução de eritema e ulceração em pacientes com mucosite oral.	Quimioterapia em pacientes (cisplatina, carboplatina ou taxol)	Mucosite oral	Patil <i>et al.</i> , 2015
Quercetina	Frutas e vegetais	Antioxidante e anti-inflamatório. Aumento na expressão de p-Erk e aumento na proliferação de enterócitos, redução da expressão de caspase-3 e diminuição da apoptose em células normais	Lesão intestinal induzida pelo quimioterápico metotrexato em ratos	Gastrotoxicidade	Sukhotnik <i>et al.</i> , 2018
Flavonoides e taninos condensados	Extrato aquoso de <i>Guazuma ulmifolia</i>	Antioxidante e citotóxico	Camundongos C57BL/6 tratados com doxorubicina	Cardiotoxicidade	Santos <i>et al.</i> , (2018)
Resveratrol	Frutas e plantas medicinais	Redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). Modulação do receptor PPAR- γ e do fator nuclear NF-Kb. Prevenção na redução de marcadores de neuroplasticidade fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), receptor quinase B da tropomiosina (TrkB), receptores neurotransmissores de aminoácidos e proteína quinase II dependente de calmodulina (CaMKII).	Comprometimento cognitivo induzido por combinação de docetaxel, adriamicina e ciclofosmida em camundongos	Neurotoxicidade	Shi <i>et al.</i> , 2018
Proantocianidinas	Extrato da semente de uva (<i>Vitis vinífera</i>)	Antioxidante e anti-inflamatório. Redução na expressão de p53 e proteínas pró-inflamatórias, aumento da expressão de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx), redução da peroxidação lipídica	Lesão no fígado induzida por talidomida e quimioterápico carboplatina em ratos	Hepatotoxicidade	Yousef <i>et al.</i> , 2019
Ácido cafeico, vanilina, ácido ferulico, ácido cinâmico, pinobanksina, galangina	Nanocapsulas com própolis	Diminuição dos níveis de MDA, aumento de GSH e aumento dos níveis de enzimas antioxidantes (CAT e GPx). Atenuação de apoptose em tecidos do rim. Redução dos níveis de Bax e aumento de Bcl-2	Lesão nos rins induzida pelo quimioterápico cisplatina em ratos	Nefrotoxicidade	Seven <i>et al.</i> , 2020
Compostos fenólicos e flavonoides	Extrato das folhas da árvore-do-caril (<i>Murraya koenigii</i>)	Redução dos níveis de marcador de disfunção cardíaca (NT-pro). Redução dos níveis de AST e LDH (marcadores de dano cardíaco). Redução da enzima inflamatória (MPO). Aumento do nível de enzimas antioxidantes e redução da peroxidação lipídica.	Cardiotoxicidade induzida por doxorubicina em ratos	Cardiotoxicidade	Sandamali <i>et al.</i> , 2020

Adicionalmente, outra vertente de estudos exploram os efeitos anticâncer em diferentes linhagens cancerígenas resistentes a quimioterápicos (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos adjuvantes e citotóxicos de extratos ou compostos de produtos naturais frente a diferentes tipos de câncer.

Composto	Fonte	Efeito/Mecanismo	Técnicas/modelos	Linhagem cancerígena	Referências
Curcumina (Combinação com mitomicina C)	<i>Curcuma longa</i>	Redução de proteínas anti-apoptóticas Bcl 2 e Bcl-w. Aumento dos níveis de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bak e Bik). Ativação de caspase-3 e 9. Aumento de 15% de apoptose.	Ensaios <i>in vitro</i> MTT Western blotting Citometria de fluxo	MCF-7 e MDA-MB-231 (linhagens de câncer de mama resistentes a mitomicina c)	Zhou <i>et al.</i> , 2017
Wogonina (Combinação com adriamicina)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Supressão do fator de transcrição Nrf2 via inativação do NF-κB. Aumento significativo da morte apoptótica via inibição do Nrf2. Potencialização do efeito inibitório sobre o crescimento do tumor <i>in vivo</i> . Supressão da via Stat3/Nrf2 <i>in vivo</i>	Ensaios <i>in vitro</i> MTT Citometria de fluxo Western blotting RT-PCR Modelo <i>in vivo</i> utilizando camundongos xenografados	K562/A02 e K562R (linhagens de leucemia resistentes a adriamicina)	Xu <i>et al.</i> , 2017b
Gingenosídeo RD (Combinação com cisplatina)	Ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	Parada do ciclo celular na fase G0/G1 Reversão de resistência através da regulação negativa da via do Nrf2. Redução dos níveis de MDR1	Ensaios <i>in vitro</i> CCK-8 Citometria de fluxo Western blotting	A549/DDP Linhagem de câncer de pulmão de células pequenas	Chian <i>et al.</i> , 2019
Nemorossoma (Combinação com doxorubicina)	Extrato de própolis cubana	Quimiossensibilização e potencialização do efeito citotóxico. Aumento de ROS. Parada do ciclo celular na fase G0/G1. Despolarização da membrana mitocondrial	Ensaios <i>in vitro</i> LDH Citometria de fluxo	LoVo Dox (linhagem de câncer de cólon resistente a doxorubicina)	Fríon-Herrera <i>et al.</i> , 2019
Proantocianidinas (Combinação com 5-Fluorouracil e oxaliplatina)	Extrato da semente de uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Reversão da resistência inerente e adquirida. Sensibilização a morte por apoptose e aumento da frequência de morte apoptótica. Regulação negativa de genes associados a expressão de proteínas de membrana transportadoras. Diminuição da atividade de proteínas transportadoras ABC e ressensibilização de tumor a quimioterápicos	Ensaios <i>in vitro</i> Viabilidade celular Citometria de fluxo Modelo <i>in vivo</i> utilizando camundongos xenografado	HCT116-For e H716 (linhagens de câncer colo-retal resistentes a oxiplatina e 5-fluorouracil)	Ravindranathan & Goel, 2019
Harmano (alcalóide) (Combinação com β-ciclodextrina)	Plantas medicinais, café, vinho	Quimiossensibilização a agentes quimioterápicos. Aumento da frequência de morte apoptótica. Aumento da permeabilidade e facilitação da entrada de ativos.	Ensaios <i>in vitro</i> MTT Citometria de fluxo	A2058 (linhagem de melanoma resistente a 5-fluorouracil e dacarbazina)	Ferraz <i>et al.</i> , 2020

Contudo, o potencial dos produtos naturais está longe de ser totalmente explorado. Estima-se que existam cerca de 8,7 milhões de espécies de plantas e animais em todo mundo, e apenas 1,6 milhões (18,3%) de espécies foram identificadas e descritas até o momento (National Geographic Society, 2021). Dentre os países com maior biodiversidade, encontra-se o Brasil, com mais de 116.839 espécies de animais e 46.355 espécies vegetais conhecidas, espalhadas em seis

biomas terrestres e três grandes ecossistemas marinhos (Ministério do Meio Ambiente, 2024b). A extrema riqueza em biodiversidade, atrai a atenção de pesquisadores nacionais e internacionais devido a elevada possibilidade de novas alternativas terapêuticas utilizando os produtos naturais.

O Cerrado, segundo maior bioma do país, aporta cerca de 14 mil espécies de animais e 13 mil espécies vegetais (EMBRAPA, 2021; IBGE, 2021), e sua biodiversidade tem sido foco de uma parcela de estudos que investigam as ações farmacológicas de plantas medicinais. Pesquisas tem evidenciado as propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antimutagênica, antiobesidade e anticâncer de diferentes espécies de plantas (Campos *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016; Baldivia *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2019; Monteiro-Alfredo *et al.*, 2020). Enquanto outra parcela de estudos tem constatado as propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticâncer, investigando-se produtos apícolas como a própolis (Campos *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015, Bonamigo *et al.*, 2017) e geoprópolis (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b).

2.9. Abelhas sem ferrão e produtos apícolas

A família Apidae engloba o maior grupo de espécies de abelhas eussociais do mundo (Kwapong, 2010). Dentre estas, destaca-se a subfamília Apinae, da qual podemos encontrar os meliponíneos, que são abelhas pertencentes a tribo meliponini (Camargo & Pedro, 2023a). Como possuem o ferrão atrofiado, são conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão (Engel, 2023).

Estas abelhas estão presentes em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Lavinias *et al.*, 2019). São encontradas em florestas tropicais e nubladas, e em terras áridas (Toledo-Hernández, 2022). Mais de 600 espécies de abelhas sem ferrão já foram descritas (Engel, 2023), sendo o Brasil o país que apresenta o maior nível de biodiversidade. No país são encontradas 259 espécies e 28 gêneros, e dentre estes, 103 espécies são endêmicas (Nogueira, 2023).

As abelhas sem ferrão são importantes polinizadoras, contribuindo para a reprodução de muitas cultivares utilizadas para a alimentação humana, tais como café, abacate, pepino, coco, cupuaçu, morango, pimenta e tomate (Slaa *et al.*, 2006). Além dos serviços de polinização, as abelhas sem ferrão possuem importância em práticas culturais e religiosas de muitos povos antigos e atuais (Engel *et al.*, 2023).

Uma destas práticas é a criação de abelhas sem ferrão, conhecida como “meliponicultura”. Existem relatos de que a meliponicultura tem sido realizada há séculos por povos indígenas há muito antigos, como por exemplo, a própria civilização Maia (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). No Brasil, a criação de abelhas sem ferrão é realizada desde tempos remotos pela tribo Kayapó da Bacia Amazônica, e nos estados do Maranhão, Rio Grande do Norte e Pernambuco existem polos bem sucedidos da criação de espécies locais (Associação Brasileira de Estudos das Abelhas, 2020).

As abelhas sem ferrão produzem diferentes produtos, incluindo a cera, cerume, pão de abelha, mel, própolis e geoprópolis (Al-Hatamleh, 2020). Estes produtos apícolas correspondem a recursos naturais que podem ser explorados economicamente e de maneira sustentável, trazendo possibilidades de: (I) geração de empregos e renda, (II) valorização do conhecimento tradicional, educação ambiental (valorização das abelhas e seus serviços de polinização), (III) oportunidades para desenvolvimento científico e inovação e (IV) conservação biológica das abelhas sem ferrão (Barbiéri & Franco, 2020).

Dentre os produtos das abelhas sem ferrão, a cera é secretada por meio de glândulas existentes no dorso do abdome (Nogueira-Neto, 1997). Quando misturada com resinas vegetais, a cera se torna o cerume, sendo ambos os produtos utilizados como materiais de construção da estrutura interna de seus ninhos, principalmente os potes que são utilizados para armazenar alimento, favos para o desenvolvimento da prole e também para formação de invólucros que tem por função auxiliar no controle da temperatura (Kwanpong, 2010; Villas-Boas, 2018).

Os grãos de pólen que são coletados das flores, são armazenados em potes de cerume, onde passam pelo processo de fermentação láctica para gerar o pão de abelha (Al-Hatamleh, 2020). Este produto é rico em proteínas e vitaminas, compostos bioativos da classe dos flavonoides e possui propriedades antimicrobiana, antidiabética e antioxidante (Al-Hatamleh, 2020; Barta *et al.*, 2022).

Além deste, as abelhas sem ferrão também produzem o mel, como mencionado anteriormente. Para a fabricação desta iguaria, o néctar das flores é coletado e modificado através de enzimas presentes em glândulas salivares e hipofaríngeas (Ball *et al.*, 2007). Considerado como um produto único, o mel das abelhas sem ferrão apresenta uma combinação distinta de doçura e acidez, além de textura notavelmente

mais fluida (Biluca *et al.*, 2016; Jalil *et al.*, 2017). Este tipo de mel atrai a atenção de consumidores não somente por suas características organolépticas, mas também por ser descrito tradicionalmente como um produto natural medicinal para tratar doenças (Bijlsma *et al.*, 2006; Vit, 2013). De acordo com a literatura, o mel das abelhas sem ferrão possui compostos bioativos como ácidos fenólicos e flavonoides, além de possuir as propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante (Jalil *et al.*, 2017; Pimentel *et al.*, 2022).

Outro produto que também atrai atenção pela promoção de benefícios a saúde humana é a própolis. Este produto é caracterizado como uma mistura viscosa produzida pelas abelhas sem ferrão a partir de exsudatos e resinas vegetais, cera e secreções salivares (Nogueira-Neto, 1997; Lavinias *et al.*, 2019). Este material protege o ninho de fatores físicos e biológicos, sendo utilizado para selar aberturas e fissuras (Kwapong, 2010) e como agente antimicrobiano (Simone-Finstrom & Spivak, 2010; Rocha *et al.*, 2023).

A própolis é um produto com importantes ações medicinais. É considerada como um antibiótico natural efetivo no tratamento de infecções no corpo, como um agente promotor da cicatrização de feridas, como regulador da pressão arterial e imunoestimulante (Kwapong, 2010). Seu uso terapêutico na saúde humana pode ser relacionado aos seus efeitos antioxidante, antimicrobiano, antiviral, anti-inflamatório e anticâncer (Lavinias *et al.*, 2018; Zulhendri *et al.*, 2021).

A composição precisa da própolis bruta varia de acordo com a fonte (Zulhendri *et al.*, 2021). Em geral, sua composição contém aproximadamente 50% de resinas e bálsamos vegetais, 30% de cera de abelhas, 10 % de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5 % de outras substâncias, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, estilbenos, açúcares, ácidos graxos, minerais e vitaminas (Barlak *et al.*, 2011; Anjum *et al.*, 2019; Rocha *et al.*, 2023). Adicionalmente, algumas espécies de abelhas sem ferrão misturam a própolis com solo ou argila, produzindo um produto conhecido como geoprópolis (Rocha *et al.*, 2023).

2.9.1. A geoprópolis das abelhas sem ferrão

A geoprópolis é constituída por resinas vegetais, pólen, secreções mandibulares, cera e, por fim, terra, que confere a ela características únicas (Dutra *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2019). Embora alguns autores a descrevam como sinônimo

de própolis, essa informação é incorreta (Popova *et al.*, 2019). A geoprópolis é composta principalmente por solo (Ferreira *et al.*, 2019), apresentando aproximadamente 90 % deste material em sua constituição (Bonsucesso *et al.*, 2018). Adicionalmente, a geoprópolis é produzida exclusivamente por algumas espécies de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini (Nogueira-Neto, 1997; Popova *et al.*, 2019), especialmente as espécies pertencentes ao gênero *Melipona* (Souza *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014) (Figura 20).

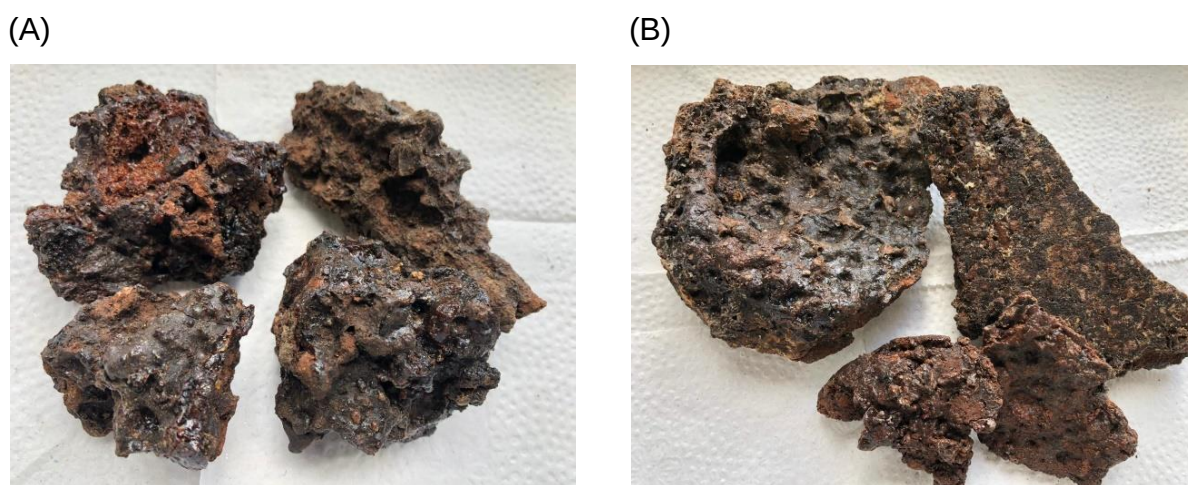


Figura 20. Amostras de geoprópolis coletadas no estado de Mato Grosso do Sul. Amostras produzidas pelas espécies de abelhas sem ferrão (A) *Melipona orbignyi* e (B) *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Fonte: o autor).

As abelhas sem ferrão utilizam este recurso natural como material de construção, para formar uma barreira protetora ao redor da colmeia, como parte estrutural interna e da entrada de seus ninhos, e para vedar fissuras e selar orifícios de entrada (Nogueira-Neto, 1997; Ferreira *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2020).

A geoprópolis tem sido utilizada na medicina popular para fortalecer as defesas naturais do organismo, como agente antisséptico, no tratamento de dermatoses (Bartolomeu *et al.*, 2016), doenças inflamatórias, hemorróidas, gastrite e tosse (Siqueira *et al.*, 2020). No Brasil, estudos mencionam seu uso por comunidades indígenas da Amazônia e do estado do Maranhão, para tratar infecções oculares, doenças cutâneas, respiratórias e pulmonares (Souza *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2016).

Durante os últimos anos, a geoprópolis tem chamado atenção de pesquisadores de outras partes do mundo, tendo em vista as suas propriedades farmacológicas antimicrobiana (Cunha *et al.*, 2020), antiviral (Coelho *et al.*, 2015),

antileishmania (Dutra *et al.*, 2019), gastroprotetora (Ribeiro-Júnior *et al.*, 2015), antioxidante (Dutra *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2017b), anti-inflamatória (Franchin *et al.*, 2016), antimutagênica (Santos *et al.*, 2017a), anticâncer (Bartolomeu *et al.*, 2016), imunomodulatória (Oliveira *et al.*, 2019) cicatrizante (Sousa-Fontoura *et al.*, 2020) e antitussígena (Brodkiewicz *et al.*, 2020). Outros relatos estão associados a efeitos protetivos sobre distúrbios associados a perda óssea, como a periodontite (Cunha *et al.*, 2017) e ação antiproliferativa em células tumorais (Souza *et al.*, 2018). Dentre todas as ações biológicas já descritas, as mais investigadas são as atividades antimicrobiana, antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória, como observado na figura 21.

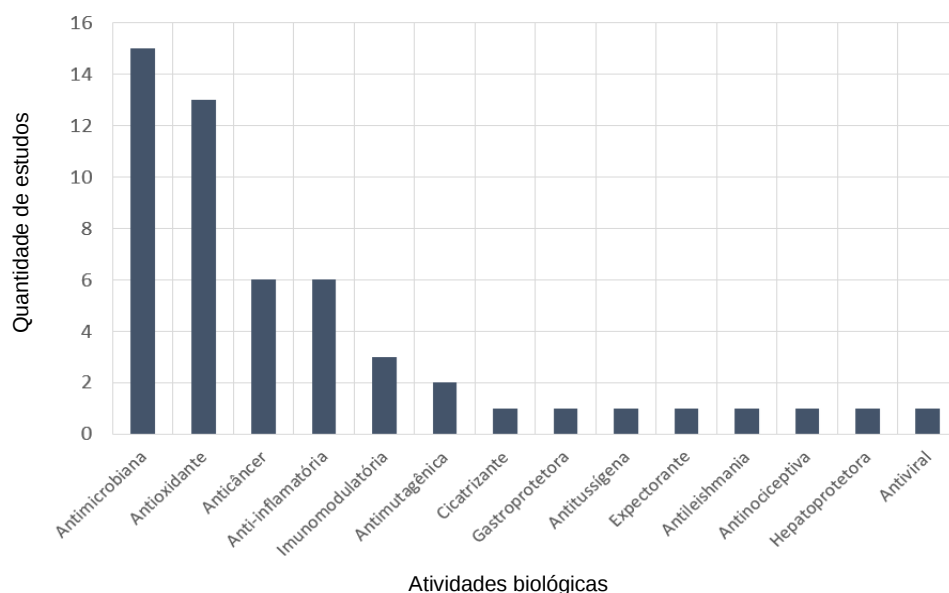


Figura 21. Quantidade de estudos para cada uma das atividades biológicas evidenciadas em geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão. Fonte: o autor. (Dados foram obtidos através de pesquisas realizadas no banco de dados da Pubmed, da plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) e Google Scholar.

Em relação aos componentes químicos, a geoprópolis apresenta uma composição química complexa, que varia de acordo com a flora, região geográfica, clima e espécies de abelhas (Siqueira *et al.*, 2020). As propriedades biológicas deste produto natural produzido por diferentes espécies de abelhas sem ferrão estão diretamente relacionadas aos seus constituintes químicos (Tabela 4).

Atualmente, já foram evidenciados ácidos fenólicos, como os ácidos gálico, cafeico, siríngico e benzóico (Zhao *et al.*, 2017), diferentes classes de flavonoides, alcaloides pirrolizidínicos e taninos hidrolisáveis (Coelho *et al.*, 2015; Sousa-Fontoura

et al., 2020) como os galotaninos e elagitaninos (Dutra et al., 2014). Adicionalmente, outros componentes químicos foram identificados, incluindo ésteres derivados do ácido cinâmico, cumarinas e benzofenonas (Cunha et al., 2016), saponinas (Dutra et al., 2008), heterosídeos derivados de fenilpropano (Santos et al., 2017b), limonenos e benzaldeídos (Torres-Gonzalez et al., 2015). Além destes, foram identificados triterpenos (β -amirina, lupenona e ácido oleanólico), ácidos graxos (palmítico e esteárico), esteróides (estigmasterol e β -sitosterol), álcoois (Dutra et al., 2019), carboidratos, ácido anacárdico, alquilresorcinóis (Araújo et al., 2016) e sesquiterpenos (Santos et al., 2017a).

Tabela 4. Constituintes químicos, atividades biológicas e efeitos terapêuticos/mecanismos de ação relatados sobre geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão.

Espécie	Constituintes químicos	Atividades biológicas	Efeitos terapêuticos/ Mecanismo de ação	Referências
<i>Heterotrigona itama</i>	Ácidos fenólicos, flavonoides, triterpenos, fitoesterol	Não verificado	Não verificado	Zhao et al. (2017)
<i>Melipona beecheii</i>	estireno, benzaldeídos, limonenos, terpenos	Não verificado	Não verificado	Torres-González et al. (2015)
<i>Melipona fasciculata</i>	Ácidos fenólicos flavonoides, ácido urônico, taninos hidrolisáveis (elagitaninos, galotaninos), ácidos graxos (ácido palmítico e esteárico), esteroides (estigmasterol e β -sitosterol), álcoois, açúcares, ácido anacárdico, ácido gluconico, alquilresorcinóis, triterpenos (β -amirina, lupenona), sesterpenos (taraxerol)	Antimicrobiana	Ação antimicrobiana contra <i>Candida albicans</i> e biofilmes de <i>Streptococcus mutans</i> . Inibição do crescimento e ação fungicida sobre <i>Pythium insidiosum</i> .	Libério et al. (2011) Araújo et al. (2016)
		Anti-inflamatória	Aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), <i>in vivo</i> . Inibição das enzimas COX 1 e 2.	Libério et al. (2011) Barboza et al. (2020)
		Anticâncer	Efeito citotóxico sobre osteosarcoma canino, <i>in vitro</i> . Habilidade de recrutar macrófagos para o foco tumoral, com consequente indução de metabólitos tumorocidas. Indução de apoptose, apoptose secundária/necrose. Disrupção da membrana. Citotoxicidade em células de câncer de ovário e pulmão. Parada do ciclo celular na fase S, aumento da expressão de caspase 3 ativa, e aumento clivagem de PARP.	Cinegaglia et al. (2013) Bartolomeu et al. (2016) Barboza et al. (2020)
		Antioxidante	Redução de ERO e de íon férrico. Doação de átomos de hidrogênio.	Dutra et al. (2014)
		Pró-inflamatória/ Imunomodulatória	Redução de IL-6. Estimula a produção de TNF- α , IL-10, expressão de CD80, TLR-4 e a via do NF- κ B e autofagia.	Oliveira et al. (2016) Oliveira et al., 2019
<i>Melipona interrupta</i>	Compostos fenólicos, flavonoides (naringenina, miricetina)	Antioxidante	Redução do número de promastigotas (<i>Leishmania amazonensis</i>) viáveis. Redução de amastigotas em macrófagos infectados. Diminuição do índice de infecção.	Dutra et al. (2019)
		Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio. Redução do íon Fe ³⁺ para Fe ²⁺ .	Silva et al. (2013)
<i>Melipona mondury</i>	Ácidos fenólicos (ácido p-anicísico, cinâmico, aminobenzoico, gálico e ferúlico), flavonoides (Aromandendrina, vanilina, siringaldeído, taxifolina, ácido siringico e vanílico) Terpenos	Antibactericida	Doação de átomos de hidrogênio. Inibição da oxidação do beta-caroteno.	Santos et al. (2017c) Ferreira et al. (2019)
		Antiproliferativa	Ação bactericida frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Citotoxicidade em células de melanoma murino, leucemia e hepatocarcinoma.	

<i>Melipona orbigny</i>	Derivados de ácidos fenólicos, flavonoides (metil aromandendrina, metil naringenina, aromadendrin, naringenina), diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos	Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio. Inibição da peroxidação lipídica e redução de malondialdeído (MDA).	Santos <i>et al.</i> (2017a)
		Anti-inflamatória	Inibição da enzima hialuronidase.	
		Antimutagênica	Inibição de danos no DNA pelo agente mutagênico etilmetanosulfonato.	
		Antimicrobiana	Ação bactericida e fungicida em micro-organismos resistentes.	
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Ácidos fenólicos (ácido p-anicísico, cinâmico, aminobenzoico e gálico), flavonoides (vanilina, naringenina), aromadendrina, catequinas	Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio	Ferreira <i>et al.</i> (2019) Gabriel <i>et al.</i> (2022)
		Antimicrobiana	Ação bacteriostática contra micoplasma	Portal <i>et al.</i> (2023)
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Flavononas, terpenos, triterpenos, trigalolil, derivados de fenilpropanil heterosídeo	Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio. Inibição da peroxidação lipídica e redução de malondialdeído (MDA).	Santos <i>et al.</i> (2017b)
		Anti-inflamatória	Inibição da enzima hialuronidase.	
		Antimutagênica	Inibição de danos no DNA pelo agente mutagênico etilmetanosulfonato.	
		Antimicrobiana	Ação bactericida e fungicida em microorganismos resistentes.	
<i>Melipona scutellaris</i>	ácidos fenólicos (ácido aminobenzoico, cafeico, ferúlico, gálico, p-cumarico, siríngico), flavonoides (ácido vanílico aromadendrina, taxifolina), ésteres de ácido cinâmico, cumarinas, benzofenonas preniladas, taninos condensados (epicatequina)	Anti-inflamatória/antinociceptiva	Diminuição de hipernocicepção mecânica através da inibição da produção de IL-1B e TNF- α . Diminuição da migração de neutrófilos no processo inflamatório, dependente da via do óxido nítrico.	Franchin <i>et al.</i> (2012); Franchin <i>et al.</i> (2013)
		Antimicrobiana	Inibição do crescimento de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. mutans</i> e seus biofilmes. Inibição da aderência dos microrganismos.	Cunha <i>et al.</i> (2013a) Cunha <i>et al.</i> (2013b)
		Gastroprotetora	Aumento na produção de óxido nítrico e prostaglandinas.	Ribeiro-Junior <i>et al.</i> (2015)
		Antiproliferativa	Citotoxicidade em células de câncer de colón, próstata, ovário, pulmão e melanoma	Cunha <i>et al.</i> , (2013b) Cunha <i>et al.</i> , (2016)
<i>Melipona seminigra</i>	Ácido ferúlico, flavonoides (vanilina, aromandendrina, naringenina, miricetina), taninos condensados (catequina)	Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio. Redução do íon férrico	Silva <i>et al.</i> (2013) Ferreira <i>et al.</i> (2019)
<i>Melipona subnitida</i>	Ácido elágico, Flavonoides, fenilpropanoides, taninos hidrolisáveis, galolil glicosídeos	Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio.	Souza <i>et al.</i> (2013) Souza <i>et al.</i> (2018) Ferreira <i>et al.</i> (2022)
		Cicatrizante	Aumento na taxa de cicatrização e reepitalização de feridas em roedores. Redução do recrutamento de células pró-inflamatórias, aumento de angiogênese e produção de colágeno.	Sousa-Fontoura <i>et al.</i> (2020)
		Antimicrobiano	Ação fungistática e fungicida em <i>Candida albicans</i>	Júnior <i>et al.</i> (2019)
		Hepatoproteção	Redução dos níveis de transaminases e de alterações macroscópicas e histológicas em fígados de ratos Wistar	Paiva <i>et al.</i> (2023)
<i>Partamona cupira</i>	Fenóis (Sinalpolil fenil éster, cardanol), flavonoides (chalconas, flavonas, flavonols	Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio.	Batista <i>et al.</i> (2020)
		Antimicrobiano	Formação de halos em teste de difusão em ágar com micro-organismos gram-positivos e gram-negativo.	
		Genoproteção	Redução da genotoxicidade induzida por H ₂ O ₂ .	
		Cicatrizante	Melhoria na cicatrização de feridas em roedores (<i>Rattus norvegicus</i>). Aumento na densidade de fibroblastos e fibras de colágeno, restauração completa da camada epitelial.	

<i>Scaptotrigona jujuyensis</i>	Ácidos fenólicos (cafeico, cumárico, ferúlico), flavonoides (quercetina, apigenina, pinobanksin, galangina)	Anti-inflamatória	Redução do edema de pata induzido por carragenina e redução de granuloma induzido via subcutânea.	Brodkiewicz <i>et al.</i> , 2020
		Antitussígena	Redução da frequência de tosse induzida por licor de amônia	
		Antimicrobiana	Formação de halos em teste de difusão em ágar com micro-organismos gram-positivos e gram-negativo	
<i>Scaptotrigona postica</i>	Alcaloides pirrolizidínicos, flavonas C-glicosiladas, quercetina, metoxichalconas	Antiviral	Inibição da replicação do vírus herpes simples (HSV-1)	Coelho <i>et al.</i> (2015)
		Antioxidante	Doação de átomos de hidrogênio	Ferreira <i>et al.</i> (2017)
<i>Tetragonisca augustula</i>	Ácido α -metoxifenilacético, ácido ferúlico, flavonoides (apigenina, galangina, hispidulina, naringenina)	Não verificado	Não verificado	Ferreira <i>et al.</i> (2019)

Além disso, alguns trabalhos têm relatado a composição mineral em amostras de geoprópolis produzidas por algumas espécies de abelhas sem ferrão, comprovando a presença de macro e microelementos essenciais (Tabela 5) (Bonsucesso *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2020). Esses compostos inorgânicos são micronutrientes adquiridos exclusivamente pela alimentação, participando de diversos processos biológicos (Ferreira *et al.*, 2019).

Tabela 5. Composição mineral de macro e microelementos evidenciados em geoprópolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão.

Espécie	Macroelementos	Microelementos	Referências
<i>Melipona scutellaris</i>	K, Mg, Na	Co, Cu, Cr, Fe, Mo, Se, V, Zn	Bonsucesso <i>et al.</i> , 2018; Ferreira <i>et al.</i> , 2019;
<i>Melipona mondury</i> <i>Melipona quadrifasciata</i> <i>Tetragonisca augustula</i>	K, Mg, Na	Co, Cu, Cr, Fe, Se, V, Zn	Ferreira <i>et al.</i> , 2019;
<i>Melipona fasciculata</i> <i>Melipona flavolineata</i>	Ca, K, Mg, P	Cu, Fe, Mn, Zn	Siqueira <i>et al.</i> , 2020;
<i>Melipona seminigra</i>	Ca, K, Mg, P	Cu, Cr, Fe, Mn, Se, Zn	Ferreira <i>et al.</i> , 2019 Siqueira <i>et al.</i> , 2020;
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Ca, Mg, Na, P	Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Si, Sr, V, Zn	Ferreira <i>et al.</i> , 2020;

Apesar destes importantes relatos sobre o emergente potencial farmacológico da geoprópolis, seus efeitos terapêuticos, componentes químicos e minerais continuam incompletamente explorados, tendo em vista a existência de poucos estudos sobre este produto natural. Dentre os estudos realizados no mundo, 92% são originários do Brasil (Figura 22), detentor de grande biodiversidade de abelhas sem ferrão (Pedro, 2014). A predominância destes trabalhos vem da região nordeste do país, especificamente dos estados da Bahia e Maranhão, (Figura 23).

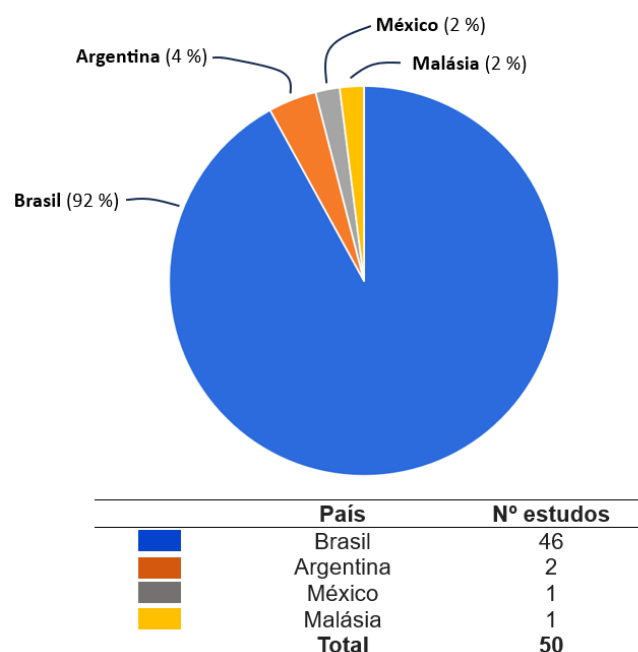


Figura 22. Relação da quantidade de estudos realizados sobre as atividades biológicas e caracterização química da geoprópolis das abelhas sem ferrão no mundo. Fonte: o autor. Dados foram obtidos através de pesquisas realizadas no banco de dados da Pubmed, da plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) e Google Scholar.

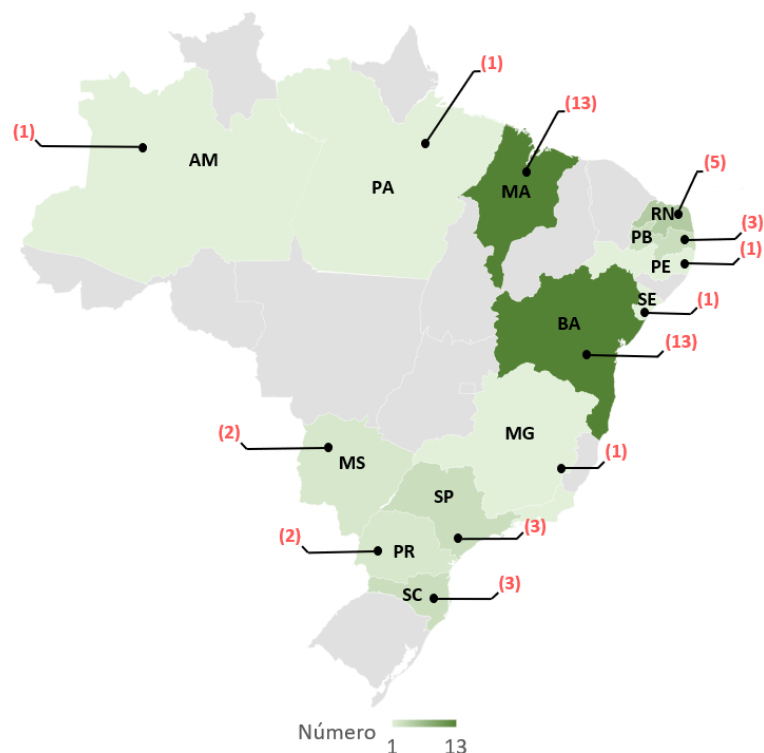


Figura 23. Quantidade de estudos realizados utilizando amostras de geoprópolis de diferentes estados do Brasil. Fonte: o autor. (Dados foram obtidos através de pesquisas realizadas no banco de dados da Pubmed, da plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) e Google Scholar.

Dentre as espécies que pertencem a tribo Meliponini, a *Melipona orbignyi* (Manduri-de-Mato-Grosso) é encontrada em regiões neotropicais da Argentina, Bolívia, Paraguai e no Brasil, onde é localizada exclusivamente nos estados de Mato-Grosso e Mato-Grosso do Sul (Camargo & Pedro, 2023b), estados compostos por biomas como Pantanal e Cerrado (Ministério Público de Mato Grosso, 2019; Input Brasil, 2021). A *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia) é outra espécie que pode ser encontrada em regiões neotropicais da Argentina, Paraguai e em vários estados do Brasil, incluindo Mato Grosso do Sul, sendo representada pelas subespécies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Camargo & Pedro, 2023c).

Na literatura, encontram-se evidenciados a composição química e atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e antimicrobiana da geoprópolis produzida por *M. orbignyi* e *M. q. anthidioides* (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b). Estes resultados são promissores, e impulsionam a necessidade de novos estudos para a verificação de suas propriedades, além da investigação e comprovação de outras propriedades terapêuticas de interesse farmacológico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis produzidas pelas espécies de abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* (EGMO) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ) contra os danos oxidativos em macromoléculas *in vitro*, contra o estresse oxidativo induzido em modelo *in vivo* e avaliar seu efeito sobre diferentes linhagens de células de melanoma e leucemia.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do EGMO e EGMQ frente a oxidação induzida pelo agente oxidante AAPH em proteína;
- Caracterizar o efeito do EGMO e EGMQ frente a danos oxidativos induzidos por radiação ultravioleta e H₂O₂ em DNA plasmidial;
- Verificar a toxicidade do EGMO e EGMQ sobre a viabilidade do modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*;
- Avaliar a ação do EGMO e EGMQ contra o estresse oxidativo induzido por juglone e contra o estresse térmico em *C. elegans*;
- Avaliar o efeito protetor do EGMO e EGMQ frente ao estresse térmico em *C. elegans* nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6h;
- Determinar o efeito do EGMO e EGMQ sobre a expectativa de vida do *C. elegans*;
- Investigar o efeito do EGMO e EGMQ sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de linhagens de rabdomiossarcoma humano (RD), carcinoma pulmonar (NCI-H292), melanoma murino (B16F10-Nex2), melanoma humano (Sk-mel-19, Sk-mel-28 e Sk-mel-103) e de leucemia humana (Jurkat e K562);
- Caracterizar os efeitos do EGMO e EGMQ sobre a migração celular das linhagens de melanoma B16F10-Nex2, Sk-Mel-19, Sk-Mel-28 e Sk-Mel-103 através do ensaio de ranhura;
- Investigar a indução de morte celular por apoptose e necrose em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e de leucemia Jurkat e K562 tratadas com EGMO e EGMQ;
- Avaliar a ação citotóxica em células de melanoma murino B16F10-Nex 2 e de leucemia Jurkat e K562 tratadas com EGMO e EGMQ na presença dos inibidores de pan-caspase (Z-VAD), caspase-3 (Z-DEVD) e RIPK-1 (NEC-1) para confirmação das vias de morte celular;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate M, Festa A, Falco M, Lombardi A, Luce A, Grimaldi A, Zappavigna S, Sperlongano P, Irace C, Caraglia M, Misso G. (2020) Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press, 98:139-153.
- Abbas Z, Rehman S. (2018) An overview of cancer treatment modalities. *Neoplasm*, 1:139-157.
- Abozenadah H, Bishop A, Bittner S, Lopez O, Wiley C, Flatt PM. (2017) Consumer chemistry: how organic chemistry impacts our lives. CC BY-NC-AS. Disponível em: <https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch105-consumer-chemistry/>. Acesso em: maio de 2021.
- Acosta MJ, Fonseca LV, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, Salviati L. (2016) Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1857(8):1079-1085.
- Adhikari A, Mondal S, Darbar S, Pal SK. (2019) Role of nanomedicine in redox mediated healing at molecular level. *Biomolecular Concepts*, 10(1):160-174.
- Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, Varol M, Jain A, Sethi G. (2019) Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*, 9(11):735.
- Ahmad S, Khan H, Shahab U, Rehman S, Rafi Z, Khan MY, Ansari A, Siddiqui Z, Mohammad J, Abdullah SMS, Uddin M. (2017) Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine. *Front Biosci (Schol Ed)*, 9:71-87.
- Al-Hatamleh MA, Boer JC, Wilson KL, Plebanski M, Mohamud R, Mustafa MZ. (2020) Antioxidant-based medicinal properties of stingless bee products: recent progress and future directions. *Biomolecules*, 10(6):923.
- Alhayaza R, Haque E, Karbasiashfar C, Sellke FW, Abid MR. (2020) The relationship between reactive oxygen species and endothelial cell metabolism. *Front Chem*, 8.
- Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH. (2020) Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players. *J Food Biochem*, 44(3).
- Almeida AJPO et al. (2022) ROS: Basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways. *Oxid Med Cell Longev*, 2022.
- Alnajjar KS, Sweasy JB. (2019) A new perspective on oxidation of DNA repair proteins and cancer. *DNA Repair*, 76:60-69.
- American Cancer Society. (2018) *Global cancer facts & figures 4th edition*. Atlanta: American Cancer Society.
- American Cancer Society. (2019a) Surgery for melanoma skin cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/surgery.html>. Acesso em: abril de 2021.
- American Cancer Society. (2019b) How chemotherapy drugs work. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>. Acesso em: abril de 2021.

American Cancer Society. (2021a) What is melanoma skin cancer? Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/what-is-melanoma.html>. Acesso em: abril de 2021.

American Cancer Society. (2021b) Risk factors for acute lymphocytic leukemia (ALL). Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/causes-risks-prevention/risk-factors.html>. Acesso em: abril de 2021.

American Cancer Society. (2021c) Risk factors for acute myeloid leukemia (AML). Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/causes-risks-prevention/risk-factors.html>. Acesso em: abril de 2021.

American Cancer Society. (2021d) What are the risk factors for chronic lymphocytic leukemia? Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/chronic-lymphocytic-leukemia/causes-risks-prevention/risk-factors.html>. Acesso em: abril de 2021.

American Cancer Society. (2023) The Global Cancer Burden. Disponível em: <https://www.cancer.org/about-us/our-global-health-work/global-cancer-burden.html>, acessado em: agosto de 2023.

Anderson RL, Balasas T, Callaghan J, Coombes RC, Evans J, Hall JA, Kinrade S, Jones D, Jones PS, Jones R, Marshall JF, Panico MB, Shaw JA, Steeg PS, Sullivan M, Tang W, Westwell AD, Ritchie JW. (2019) A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(3):185-204.

Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Dash CK. (2019) Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*, 26(7):1695-1703.

Antonio AS, Wiedemann LSM, Veiga-Júnior VF. (2020) Natural products role against COVID-19. *RSC Adv*, 10(39):23379-23393.

Araújo M JAM, Bosco SDMG, Sforcin JM. (2016) *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Braz J Microbiol*, 47:863-869.

Argüelles S, Guerrero-Castilla A, Cano M, Muñoz MF, Ayala A. (2019) Advantages and disadvantages of apoptosis in the aging process. *Ann NY Acad Sci*, 1443(1):20-33.

Arguello OAD, Haisma HJ. (2021) Apoptosis-inducing TNF superfamily ligands for cancer therapy. *Cancers*, 13(7):1543.

Arora RD, Menezes RG. (2021) Vinca alkaloid toxicity. StatPearls Publishing. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557842/>. Acesso em: maio de 2021.

Asbestos. (2021) High cost of cancer treatment. Disponível em: <https://www.asbestos.com/featured-stories/high-cost-of-cancer-treatment/>. Acesso em: março de 2021.

Associação Brasileira de Estudos das Abelhas. Abelhas sem ferrão. Disponível em: abelha.org.br, acessado em: outubro de 2023.

Awad SA, Dufva O, Ianevski A, Ghimire B, Koski J, Maliniemi P, Thomson D, Schreiber A, Heckman CA, Koskenvesa P, Korhonen M, Porkka K, Branford S, Aittokallio T, Kankainen M, Mustjoki S. (2020) RUNX1 mutations in blast-phase chronic myeloid leukemia associate with distinct phenotypes, transcriptional profiles, and drug responses. *Leukemia*, 35(4):1087-1099.

- Ayer A, Gourlay CW, Dawes IW. (2014) Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 14(1):60-72.
- Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, Kolahian S, Javaheri T, Zare P. (2020) Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*, 18(1):1-19.
- Bagheri B, Zargari M, Meshkini F, Dinarvand K, Mokhberi V, Azizi S, Rasouli M. (2016) Uric acid and coronary artery disease, two sides of a single coin: A determinant of antioxidant system or a factor in metabolic syndrome. *J Clin Diagn Res*, 10(2).
- Bain BJ. (2017) Structure and function of red and white blood cells. *Medicine*, 45(4):187-193.
- Bain BJ. (2021) Structure and function of red and white blood cells and platelets. *Medicine*.
- Baldivia DDS, Leite DF, Castro DTHD, Campos JF, Santos UPD, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Silva DB, de Picolil Souza K, dos Santos EL. (2018) Evaluation of in vitro antioxidant and anticancer properties of the aqueous extract from the stem bark of *Stryphnodendron adstringens*. *Int J Mol Sci*, 19(8):2432.
- Ball DW. (2007) The chemical composition of honey. *J Chem Educ*, 84(10):1643.
- Barbiéri C, Franco TM. (2020) Theoretical model for interdisciplinary analysis of human activities: Meliponiculture as an activity that promotes sustainability. *Ambi-Agro*, 23.
- Barboza JR, Pereira FAN, Fernandes RA, Vasconcelos CC, Cartágenas MDSDS, Oliveira Lopes AJ, Melo AC, Guimarães IS, Rocha CQ, Ribeiro MNDS. (2020) Cytotoxicity and pro-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Biology*, 9(9):292.
- Barcelos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. (2013) The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 13(7):511-518.
- Barlak Y, Değer O, Çolak M, Karataylı SC, Bozdayı AM, Yücesan F. (2011) Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Sci*, 9(1):1-11.
- Barta DG, Cornea-Cipcigan M, Margaoan R, Vodnar DC. (2022) Biotechnological processes simulating the natural fermentation process of bee bread and therapeutic properties—an overview. *Front Nutr*, 9:871896.
- Bartolomeu AR, Frión-Herrera Y, da Silva LM, Romagnoli GG, de Oliveira DE, Sforcin JM. (2016) Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomed Pharmacother*, 81:48-55.
- Basu S, Cheriyaundath S, Bem-Ze'ev A. (2018) Cell–cell adhesion: linking Wnt/ β -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. *F1000Research*, 7.
- Batista JS, da Silva JB, Costa KMDFM, da Silva Teófilo T, Félix NS, Silva FHA, ... & Viana GA. (2020) Biological activity of geopropolis produced by *Partamona cupira* (Meliponinae, Apidae) in the semiarid of the Brazilian northeast. *Res Soc Dev*, 9(11)

- Behrmann L, Wellbrock J, Fiedler W. (2018) Acute myeloid leukemia and the bone marrow niche: take a closer look. *Front Oncol*, 8:444.
- Bergers G, Fendt SM. (2021) The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nat Rev Cancer*, 21(3):162-180.
- Bernabeu E, Cagel M, Lagomarsino E, Moretton M, Chiappetta DA. (2017) Paclitaxel: what has been done and the challenges remain ahead. *Int J Pharm*, 526(1-2):474-495.
- Bernard SC, Abdelsamad EH, Johnson PA, Chapman DL, Parvathaneni M. (2017) Pediatric leukemia: Diagnosis to treatment A review. *J Cancer Clin Trials*, 2(2):1.
- Bernardini S, Tiezi A, Laghezza Masci V, Ovidi E. (2018) Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Nat Prod Res*, 32(16):1926-1950.
- Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. (2021) Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*, 18(5):1106-1121.
- Bhardwaj V, He J. (2020) Reactive oxygen species, metabolic plasticity, and drug resistance in cancer. *Int J Mol Sci*, 21(10):3412.
- Bié J, Sepodes B, Fernandes PC, Ribeiro MH. (2023) Polyphenols in health and disease: Gut microbiota, bioaccessibility, and bioavailability. *Compounds*, 3(1):40-72.
- Bijlsma L, de Bruijn LL, Martens EP, Sommeijer MJ. (2006) Water content of stingless bee honeys (Apidae, Meliponini): interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 37(4):480-486.
- Biluca FC, Braghini F, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. (2016) Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). *J Food Compos Anal*, 50:61-69.
- Birkbak NJ, McGranahan N. (2020) Cancer genome evolutionary trajectories in metastasis. *Cancer Cell*, 37(1):8-19.
- Biswal BN, Das SN, Das BK, Rath R. (2017) Alteration of cellular metabolism in cancer cells and its therapeutic prospects. *J Oral Maxillofac Pathol*, 21(2):244.
- Block KI, Gyllenhaal C, Lowe L, Amedei A, Amin AR, Aquilano K, Arbisser J, Arreola A, Arzumanyan A, Ashraf SS, Azmi AS, Benencia F, Bhakta D, Bilsland A, Bishayee A, Blain SW, Block PB, Zollo M, Sidransky D. (2015) Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. In: *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, Vol. 35, p. S276-S304.
- Bonamigo T, Campos JF, Oliveira AS, Torquato HFV, Balestieri JBP, Cardoso CAL, Paredes-Gamero EJ, de Picolil Souza K, dos Santos EL. (2017) Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. *PLoS One*, 12(9)
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F. (2010) Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278(1):55-67.
- Bonsucesso JS, Gloaguen TV, do Nascimento AS, de Carvalho CAL, Dias FDS. (2018) Metals in geopropolis from beehive of *Melipona scutellaris* in urban environments. *Sci Total Environ*, 634:687-694.
- Boraldi F, Lofaro FD, Quaglino D. (2021) Apoptosis in the Extraosseous Calcification Process. *Cells*, 10(1):131.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6):394-424.
- Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, de Guevara RL, Cepero E, Boise LH. (2013) Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol*, 14(1):1-9.
- Brewer MS. (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 10(4):221-247.
- Brodkiewicz IY, Reynoso MA, Vera NR. (2020) In vivo evaluation of pharmacological properties of Argentine stingless bee geopropolis. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci*, 9(1):1-8.
- Brokatzky D, Kretz O, Häcker G. (2020) Apoptosis functions in defense against infection of mammalian cells with environmental chlamydiae. *Infect Immun*, 88(6).
- Brown C. (2016) Targeted therapy: an elusive cancer target. *Nature*, 537(7620).
- Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. (2020) Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci*, 21(9):3233.
- Butler MS, Robertson AA, Cooper MA. (2014) Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep*, 31(11):1612-1661.
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL. (2015) Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem Photobiol*, 91(1):140-155.
- Cadet J, Wagner JR. (2013) DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Camargo JMF, Pedro SRM. (2023a) Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR, eds. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* - online version. Disponível em: <https://moure.cria.org.br/catalogue?id=1158>. Acesso em: 17 de março, 2023.
- Camargo JMF, Pedro SRM. (2023b) Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR, eds. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* - online version. Disponível em: <https://moure.cria.org.br/catalogue?id=117825>. Acesso em: 17 de março, 2023.
- Camargo JMF, Pedro SRM. (2023c) Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR, eds. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* - online version. Disponível em: <https://moure.cria.org.br/catalogue?id=117813>. Acesso em: 17 de março, 2023.
- Campos JF, dos Santos UP, Macorini LFB, de Melo AMMF, Balestieri JBP, Paredes-Gamero EJ, Cardoso CAL, de Picolil Souza K, dos Santos EL. (2014) Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem Toxicol*, 65:374-380.
- Campos JF, Santos UPD, Rocha PDSD, Damião MJ, Balestieri JBP, Cardoso CAL, Paredes-Gamero EJ, Estevinho LM, de Picolil Souza K, dos Santos EL. (2015) Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015.

Campos JF, de Castro DTH, Damião MJ, Vieira Torquato HFV, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Estevinho LM, de Picolil Souza K, Santos ELD. (2016) The chemical profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev*, 2016.

Cancer Treatment Centers of America. (2021a) Stem cell transplantation for leukemia. Disponível em: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/leukemia/treatments/stem-cell-transplantation>. Acesso em: abril de 2021.

Cancer Treatment Centers of America. (2021b) Immunotherapy. Disponível em: <https://www.cancercenter.com/treatmentoptions/precisionmedicine/immunotherapy>. Acesso em: abril de 2021.

Carocho M, Ferreira ICA. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 51:15-25.

Carr S, Smith C, Wernberg J. (2019) Epidemiology and risk factors of melanoma. *Surg Clin North Am*, 100(1):1-12.

Carvalho JTG, Silva Baldivia D, Leite DF, Araújo LCA, Toledo Espindola PP, Antunes KA, Rocha PS, Picolil Souza K, dos Santos EL. (2019) Medicinal plants from Brazilian Cerrado: antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. *Oxid Med Cell Longev*, 2019.

Castro DTH, Campos JF, Damião MJ, Torquato HFV, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Rodrigues EG, de Picolil Souza K, dos Santos EL. (2019) Ethanolic extract of *Senna velutina* roots: chemical composition, in vitro and in vivo antitumor effects, and B16F10-Nex2 melanoma cell death mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*, 2019.

CDC. (2021) Risk Factors and Cancer. Disponível em: https://www.cdc.gov/cancer/risk_factors.htm. Acesso em: abril de 2021.

Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, Keller JN. (2007) Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 1773(2):93-104.

Chen HH, Kuo MT. (2017) Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, 8(37):62742.

Chen Q, Kang J, Fu C. (2018) The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct Target Ther*, 3(1):1-11.

Chen J, Kos R, Garssen J, RedeGeld F. (2019) Molecular insights into the mechanism of necroptosis: the necrosome as a potential therapeutic target. *Cells*, 8(12):1486.

Chian S, Zhao Y, Xu M, Yu X, Ke X, Gao R, Yin L. (2019) Ginsenoside Rd reverses cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer A549 cells by downregulating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 30(8):838-845.

Chiang SP, Cabrera RM, Segall JE. (2016) Tumor cell intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 311(1).

Chiorazzi N, Chen SS, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. (2021) Feb 1;11(2):a035220.

Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AM. (2019) Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*, 4(15).

Cibanal IL, Fernández LA, Positano GG, Chebataroff LB, Garayalde AF, Gallez LM, Pérez ES. (2020) Chemical characterization and in vitro antimicrobial activity of honeybee propolis and *Scaptotrigona jujuyensis* geopropolis against tomato pathogenic bacteria. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(5):1799-1808.

Cinegaglia NC, Bersano PRO, Araújo MJAAM, Búfalo MC, Sforcin JM. (2013) Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:1-6.

Coelho GR, Mendonça RZ, Vilar KDS, Figueiredo CA, Badari JC, Taniwaki N, Negri G. (2015) Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against *antiherpes simplex* virus (HSV-1). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015:1-10.

Compton C. (2020) *Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences*. Springer Nature.

Copelan EA. (2006) Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 354(17):1813-1826.

Corpas FJ, Chaki M, Leterrier M, Barroso JB. (2009) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signal Behav*, 4(10):920-923.

Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW, Dollin A, Heard T, Aguilar I, Nogueira-Neto P. (2006) Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37(2):275-292.

Cragg GM, Newman DJ. (2001) Medicinals for the millennia: the historical record. *Ann N Y Acad Sci*, 953(1):3-25.

Cragg GM, Newman DJ. (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta (BBA) Gen Subjects*, 1830(6):3670-3695.

Craythorne E, Al-Niami F. (2017) Skin cancer. *Medicine*, 45(7):431-434.

Cunha MGD, Franchin M, Galvão LCDC, Bueno-Silva B, Ikegaki M, de Alencar SM, Rosalen PL. (2013a) Apolar bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis on *Streptococcus mutans* biofilm. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:1-7.

Cunha MG, Franchin M, Galvão L, de Ruiz A, de Carvalho JE, Ikegaki M, Alencar SM, Koo H, Rosalen PL. (2013b) Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement Altern Med*, 13(1):1-9.

Cunha MG, Rosalen PL, Franchin M, de Alencar SM, Ikegaki M, Ransom T, Beutler JA. (2016) Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. *Planta Med*, 82(3):190-194.

Cunha MG, Ramos-Junior ES, Franchin M, Taira TM, Beutler JA, Franco GCN, Ikegaki M, Alencar SM, Fukada SY, Rosalen PL. (2017) Effects of cinnamoyloxy-mammeisin from geopropolis on osteoclast differentiation and *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *J Nat Prod*, 80(6):1893-1899.

Cunha MG, Sardi JDCO, Freireiss IA, Franchin M, Rosalen PL. (2020) Antimicrobial, anti-adherence and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of a 4-phenyl coumarin derivative isolated from Brazilian geopropolis. *Microb Pathog*, 139:103855.

- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1):49-63.
- D'Arcy MS. (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43(6):582-592.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*, 9(4):169-176.
- Dao DQ, Ngo TC, Thong NM, Nam PC. (2017) Is Vitamin A an antioxidant or a pro-oxidant? *J Phys Chem B*, 121(40):9348-9357.
- Davis A, Viera AJ, Mead MD. (2014) Leukemia: an overview for primary care. *Am Fam Physician*, 89(9):731-738.
- Dehelean CA, Marcovici I, Soica C, Mioc M, Coricovac D, Iurciuc S, Cretu OM, Pinzaru I. (2021) Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy. *Molecules*, 26(4):1109.
- Del Prete V, Chaloupka K, Holzmann D, Fink D, Levesque M, Dummer R, Goldinger SM. (2016) Noncutaneous melanomas: a single-center analysis. *Dermatology*, 232(1):22-29.
- Delgado J, Nadeu F, Colomer D, Campo E. (2020) Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*, 105(9):2205.
- Delgado-García M, Flores-Gallegos AC, Kirchmayr M, Rodríguez JA, Mateos-Díaz JC, Aguilar CN, Muller M, Camacho-Ruiz RM. (2019) Bioprospection of proteases from *Halobacillus andaensis* for bioactive peptide production from fish muscle protein. *Electron J Biotechnol*, 39:52-60.
- Di Mascio P, Martinez GR, Miyamoto S, Ronsein GE, Medeiros MH, Cadet J. (2019) Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins. *Chem Rev*, 119(3):2043-2086.
- Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. (2016) Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev*, 2016.
- Dias DA, Urban S, Roessner U. (2012) A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2):303-336.
- Dickens E, Ahmed S. (2018) Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 36(3):134-138.
- Dickinson AM, Norden J, Li S, Hromadnikova I, Schmid C, Schmetzer H, Jochem-Kolb HG. (2017) Graft-versus-leukemia effect following hematopoietic stem cell transplantation for leukemia. *Front Immunol*, 8:496.
- Didona D, Paolino G, Bottoni U, Cantisani C. (2018) Non melanoma skin cancer pathogenesis overview. *Biomedicines*, 6(1):6.
- Dizdaroglu M, Jaruga P. (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*, 46(4):382-419.
- Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang D. (2019) NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol*, 23:101107.

- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. (2015) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 373(12):1136-1152.
- D'Souza LC, Mishra S, Chakraborty A, Shekher A, Sharma A, Gupta SC. (2020) Oxidative stress and cancer development: are noncoding RNAs the missing links? *Antioxid Redox Signal*, 33(17):1209-1229.
- Dumanović J, Nepovimova E, Natić M, Kuča K, Jačević V. (2020) The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Front Plant Sci*, 11.
- Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRDO, Costa MCP, Ribeiro MNS. (2008) Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Rev Bras Farmacogn*, 18(4):557-562.
- Dutra RP, Abreu BVD, Cunha MS, Batista MCA, Torres LMB, Nascimento FRF, Ribeiro MNS, Guerra RNM. (2014) Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J Agric Food Chem*, 62(12):2549-2557.
- Dutra RP, Bezerra JL, Silva MCPD, Batista MCA, Patrício FJB, Nascimento FRF, Ribeiro MNS, Guerra RNM. (2019) Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. *Rev Bras Farmacogn*, 29:287-293.
- Dwivedy AK, Singh VK, Das S, Chaudhari AK, Upadhyay N, Singh A, Singh A, Dubey NK. (2019) Biodiversity Bioprospection with Respect to Medicinal Plants. In: *Ethnopharmacology and Biodiversity of Medicinal Plants*, pp. 3-30. Apple Academic Press.
- El Ridi R, Tallima H. (2017) Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *J Adv Res*, 8(5):487-493.
- Elert E. (2013) Living with leukaemia. *Nature*, 498(7455).
- Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4):495-516.
- Elsayed ME, Sharif MU, Stack AG. (2016) Transferrin saturation: a body iron biomarker. *Adv Clin Chem*, 75:71-97.
- Emanuelli M, Sartini D, Molinelli E, Campagna R, Pozzi V, Salvolini E, Offidani A. (2022) The double-edged sword of oxidative stress in skin damage and melanoma: From physiopathology to therapeutical approaches. *Antioxidants*, 11(4):612.
- Embrapa. (2021) Cerrado. Disponível em: <https://www.embrapa.br/contando-ciencia/bioma-cerrado>. Acesso em: 17 de janeiro de 2021.
- Engel MS, Rasmussen C, Ayala R, de Oliveira FF. (2023) Stingless bee classification and biology (Hymenoptera, Apidae): a review, with an updated key to genera and subgenera. *ZooKeys*, 1172:239.
- Ernst T, Busch M, Rinke J, Ernst J, Haferlach C, Beck JF, Hochhaus A, Gruhn B. (2018) Frequent ASXL1 mutations in children and young adults with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 32(9):2046-2049.

Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga NA, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH. (2020) A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol*, 27(s2):87-97.

Estanqueiro M, Amaral MH, Conceição J, Lobo JMS. (2015) Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 126:631-648.

Fahradyan A, Howell AC, Wolfswinkel EM, Tsuhha M, Sheth P, Wong AK. (2017) Updates on the management of non-melanoma skin cancer (NMSC). In: *Healthcare*, 5:82. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Falowo AB, Fayemi PO, Muchenje V. (2014) Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res Int*, 64:171-181.

Falzone L, Salomone S, Libra M. (2018) Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front Pharmacol*, 9:1300.

Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. (2020) Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1):1-17.

Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. (2014) Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev*, 33(2):79-97.

Ferraz CAA, de Oliveira Júnior RG, de Oliveira AP, Groult H, Beaugeard L, Picot L, Nunes XP. (2020) Complexation with β -cyclodextrin enhances apoptosis-mediated cytotoxic effect of harman in chemoresistant BRAF-mutated melanoma cells. *Eur J Pharm Sci*, 150:105353.

Ferreira JM, Fernandes-Silva CC, Salatino A, Message D, Negri G. (2017) Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and likely botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017.

Ferreira BL, Gonzaga LV, Vitali L, Micke GA, Maltez HF, Ressureição C, Fett R. (2019) Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. *Food Res Int*, 126:108683.

Ferreira RC, de Souza Dias F, de Aragão Tannus C, Santana FB, dos Santos DCM, de Souza Dias F, Castro MS, Brandão HN, Junior Santos AF, Silva LCRC, Chinalia FA. (2020) Essential and potentially toxic elements from Brazilian geopropolis produced by the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* using ICP OES. *Biol Trace Elem Res*, 199(9):3527-3539.

Ferreira JM, Negri G, Salatino MLF, Salatino A. (2022) Chemical profile and antioxidant activity of geopropolis from *Melipona subnitida* collected inside and outside the nest. *Quím Nova*, 45:1189-1196.

Fontana F, Raimondi M, Di Domizio A, Moretti RM, Marelli MM, Limonta P. (2019) Unraveling the molecular mechanisms and the potential chemopreventive/therapeutic properties of natural compounds in melanoma. In: *Sem Cancer Biol*, vol. 59, pp. 266-282. Academic Press.

Fouad YA, Aanei C. (2017) Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*, 7(5):1016.

- Franchin M, da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Koo H, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. (2012) Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . J Ethnopharmacol, 143(2):709-715.
- Franchin M, da Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Bueno-Silva B, Alencar SM, Ikegaki M, Luiz Rosalen P. (2013) Bioactive fraction of geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases neutrophils migration in the inflammatory process: involvement of nitric oxide pathway. Evid Based Complement Alternat Med, 2013.
- Franchin M, Rosalen PL, da Cunha MG, Silva RL, Colón DF, Bassi GS, Alencar SM, Ikegaki M, Filho-Alves JC, Cunha FQ, Beutler JA, Cunha TM. (2016) Cinnamoyloxymammeisin isolated from geopropolis attenuates inflammatory process by inhibiting cytokine production: involvement of MAPK, AP-1, and NF- κ B. J Nat Prod, 79(7):1828-1833.
- Françoso RD, Brandão R, Nogueira CC, Salmons YB, Machado RB, Colli GR. (2015) Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. Nat Conserv, 13(1):35-40.
- Fríón-Herrera Y, Gabbia D, Díaz-García A, Cuesta-Rubio O, Carrara M. (2019) Chemosensitizing activity of Cuban propolis and nemorosone in doxorubicin resistant human colon carcinoma cells. Fitoterapia, 136:104173.
- Fujita TC, Sousa-Pereira N, Amarante MK, Watanabe MAE. (2021) Acute lymphoid leukemia etiopathogenesis. Mol Biol Rep, 48(2):817-822.
- Gabriel MB, Carneiro MJ, de Camargo RC, Sawaya AC. (2022) The chemical composition and antioxidant activity of mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) geopropolis varies more due to region than month of collection. Nat Prod Res, 36(6):1626-1630.
- Gajera HK, Zaveri MA, Nayak DR. (2022) Patch-based local deep feature extraction for automated skin cancer classification. Int J Imaging Syst Technol, 32(5):1774-1788.
- García-Montero P, de Gálvez-Aranda MV, Blázquez-Sánchez N, Rivas-Ruiz F, Millán-Cayetano JF, García-Harana C, de Troya Martín M. (2020) Quality of life during treatment for cervicofacial non-melanoma skin cancer. J Cancer Educ, 35:1-7.
- García-Román J, Zentella-Dehesa A. (2013) Vascular permeability changes involved in tumor metastasis. Cancer Lett, 335(2):259-269.
- Gaschler MM, Stockwell BR. (2017) Lipid peroxidation in cell death. Biochem Biophys Res Commun, 482(3):419-425.
- Gay LJ, Fielding-Habermann B. (2011) Contribution of platelets to tumour metastasis. Nat Rev Cancer, 11(2):123-134.
- Gęgotek A, Skrzydlewska E. (2019) Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. Chem Phys Lipids, 221:46-52.
- GeneTex. (2021) Apoptosis signalling pathway. Disponível em: https://www.genetex.com/Research/Overview/cell_biology/apoptosis. Acesso em: março de 2021.
- George VC, Dellaire G, Rupasinghe HV. (2017) Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. J Nutr Biochem, 45:1-14.

- Giansanti M, Karimi T, Faraoni I, Graziani G. (2021) High-dose vitamin C: preclinical evidence for tailoring treatment in cancer patients. *Cancers*, 13(6):1428.
- Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. (2012) Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1820(3):188-202.
- Glenn A, Armstrong CE. (2019) Physiology of red and white blood cells. *Anaesth Intensive Care Med*, 20(3):170-174.
- Global Cancer Observatory. - Globocan (2024a) Cancer Tomorrow. Incidence. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2040&single_unit=500000&types=0. Acessado em: setembro de 2024.
- Global Cancer Observatory. – Globocan (2024b) Cancer Tomorrow. Mortality. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2040&single_unit=500000&types=1. Acessado em: setembro de 2024.
- Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, Cheng H, Jin K, Ni Q, Yu X, Liu C. (2019) The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*, 18(1):1-17.
- Green DR. (2019) The coming decade of cell death research: five riddles. *Cell*, 177(5):1094-1107.
- Gregory CD, Devitt A. (2004) The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically?. *Immunology*, 113(1):1-14.
- Gui P, Bivona TG. (2022) Evolution of metastasis: new tools and insights. *Trends Cancer*, 8(2):98-109.
- Guil-Laynez JL, Guil-Guerreiro JL, Guil-Laynez A. (2019) Bioprospecting for seed oils in tropical areas for biodiesel production. *Ind Crops Prod*, 128:504-511.
- Gutmann C, Siow R, Gwozdz AM, Saha P, Smith A. (2020) Reactive oxygen species in venous thrombosis. *Int J Mol Sci*, 21(6):1918.
- Hajam YA, Rani R, Ganie SY, Sheikh TA, Javaid D, Qadri SS, Reshi MS. (2022) Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives. *Cells*, 11(3):552.
- Hallek M. (2017) Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 92(9):946-965.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (2015) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA.
- Hameister R, Kaur C, Dheen ST, Lohmann CH, Singh G. (2020) Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 108(5):2073-2087.
- Hanahan D. (2022) Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*, 12(1):31-46.
- Hanson B. (2016) Necroptosis: a new way of dying?. *Cancer Biol Ther*, 17(9):899-910.
- Hao T, Li-Talley M, Buck A, Chen W. (2019) An emerging trend of rapid increase of leukemia but not all cancers in the aging population in the United States. *Sci Rep*, 9(1):12070.

- Hassanpour SH, Dehghani M. (2017) Review of cancer from perspective of molecular. *J Cancer Res Pract*, 4(4):127-129.
- Hatzimichael E, Tuthill M. (2010) Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning Adv Appl*, 3:105.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. (2020) Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell*.
- Healthline. (2018) How Many Cells Are in the Human Body? Fast Facts. Disponível em: <https://www.healthline.com/health/number-of-cells-in-body>. Acesso em: março de 2021.
- Healy J, Tipton K. (2007) Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm*, 114(6):777-781.
- Heitzer E, Auinger L, Speicher MR. (2020) Cell-free DNA and apoptosis: how dead cells inform about the living. *Trends Mol Med*, 26(5):519-528.
- Herman H, Fazakas C, Haskó J, Molnár K, Mészáros Á, Nyúl-Tóth Á, Szabo G, Erdélyi F, Ardelean A, Hermenean A, Krizbai IA, Wilhelm I. (2019) Paracellular and transcellular migration of metastatic cells through the cerebral endothelium. *J Cell Mol Med*, 23(4):2619-2631.
- Holmström KM, Finkel T. (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(6):411-421.
- Huang Z, Liu Y, Qi G, Brand D, Zheng SG. (2018) Role of vitamin A in the immune system. *J Clin Med*, 7(9):258.
- IBGE. (2021) Biomas Brasileiros. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18307-biomas-brasileiros.html>. Acesso em: março de 2021.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*, 54(4):287-293.
- Imran A, Qamar HY, Ali Q, Naeem H, Riaz M, Amin S, Kanwal N, Ali F, Sabar MF, Nasir IA. (2017) Role of molecular biology in cancer treatment: A review article. *Iranian J Public Health*, 46(11):1475.
- Input Brasil. (2021) Mato Grosso do Sul. Disponível em: <https://www.inputbrasil.org/regioes/mato-grosso-do-sul/>. Acesso em: março de 2021.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2021a) Câncer de pele não melanoma. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>. Acesso em: março de 2021.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2021b) Câncer de pele melanoma. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em: março de 2021.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2021c) Leucemia. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em: março de 2021.
- Irazabal MV, Torres VE. (2020) Reactive oxygen species and redox signaling in chronic kidney disease. *Cells*, 9(6):1342.

- Iwamoto T. (2013) Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biol Pharm Bull*, 36(5):715-718.
- Jabbour E, Kantarjian H. (2018) Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*, 93(3):442-459.
- Jalil MAA, Kasmuri AR, Hadi H. (2017) Stingless bee honey, the natural wound healer: A review. *Skin Pharmacol Physiol*, 30(2):66-75.
- Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. (2018) Medicinal plants: Past history and future perspective. *J Herbmmed Pharmacology*, 7(1).
- Javed A, Mukhtar H, Kubra K, Lodhi S, Abaidullah S. (2020) Detection of BCR–ABL fusion gene and its transcript variants in chronic myeloid leukaemia patients—a multi-comparison study. *JPMA*, 70:1748.
- Jee JP, Lim SJ, Park JS, Kim CK. (2006) Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 63(2):134-139.
- Jenkins RW, Fisher DE. (2020) Treatment of advanced melanoma in 2020 and beyond. *J Investig Dermatol*, 141(1):23-31.
- Johnson CB, Zhang J, Lucas D. (2020) The Role of the Bone Marrow Microenvironment in the Response to Infection. *Front Immunol*, 11:3029.
- Joo WD, Visintin I, Mor G. (2013) Targeted cancer therapy—are the days of systemic chemotherapy numbered?. *Maturitas*, 76(4):308-314.
- Júnior UPS, Cabrera SP, da Silva TMG, da Silva EMS, Camara CA, Silva TMS. (2019) Geopropolis gel for the adjuvant treatment of candidiasis: formulation and in vitro release assay. *Rev Bras Farmacogn*, 29(3):278-286.
- Kalkavan H, Green DR. (2018) MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*, 25(1):46-55.
- Katz L, Baltz RH. (2016) Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43(2-3):155-176.
- Ke X, Shen L. (2017) Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Front Lab Med*, 1(2):69-75.
- Kehm R, Baldensperger T, Raupbach J, Höhn A. (2021) Protein oxidation-Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biol*, p. 101901.
- Kennedy LB, Salama AK. (2020) A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA Cancer J Clin*, 70(2):86-104.
- Khalid N, Azimpouran M. (2021) Necrosis. *StatPearls*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>. Acesso em: abril de 2021.
- Khoury MK, Gupta K, Franco SR, Liu B. (2020) Necroptosis in the pathophysiology of disease. *Am J Pathol*, 190(2):272-285.
- Kim KW, Roh JK, Wee HJ, Kim C. (2016) Natural Product Anticancer Drugs. In: *Cancer Drug Discovery*. Springer, Dordrecht, p. 113-134.

- Kirtonia A, Sethi G, Garg M. (2020) The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*, p. 1-25.
- Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaos A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. (2020) Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*, 40(11):6009-6015.
- Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. (2016) Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J*, 6(7).
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res*, 711(1-2):193-201.
- Krzyżanowska MK, Walker-Dilks C, Morris AM, Gupta R, Halligan R, Kouroukis CT, Atzema CL. (2016) Approach to evaluation of fever in ambulatory cancer patients receiving chemotherapy: A systematic review. *Cancer Treat Rev*, 51:35-45.
- Kuropatnicki AK, Kłosék M, Kucharzewski M. (2018) Honey as medicine: historical perspectives. *J Apicultural Res*, 57(1):113-118.
- Kwapong P, Aidoo K, Combey R, Karikari A. (2010) Stingless bees. Importance, management and utilization. A training manual for stingless beekeeping, 1-72.
- Lai V, Cranwell W, Sinclair R. (2018) Epidemiology of skin cancer in the mature patient. *Clin Dermatol*, 36(2):167-176.
- Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. (2017) Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168(4):670-691.
- Lavinas FC, Macedo EHB, Sá GB, Amaral ACF, Silva JR, Azevedo M, Rodrigues IA. (2019) Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Rev Bras Farmacogn*, 29:389-399.
- Lee GY, Han SN. (2018a) The role of vitamin E in immunity. *Nutrients*, 10(11):1614.
- Lee YT, Tan YJ, Oon CE. (2018b) Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*, 834:188-196.
- Lenicke C, Cochemé HM. (2021) Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell*, 81(18):3691-3707.
- Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, McCubrey JA, Candido S, Libra M. (2018) Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. *Int J Oncol*, 52(4):1071-1080.
- Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Chen ZS. (2017) Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chinese J Cancer*, 36:1-10.
- Li Y, Egranov SD, Yang L, Lin C. (2019a) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs-mediated cancer metastasis. *Genes Chromosomes Cancer*, 58(4):200-207.
- Li X, Li Y, Lu W, Chen M, Ye W, Zhang D. (2019b) The tumor vessel targeting strategy: A double-edged sword in tumor metastasis. *Cells*, 8(12):1602.
- Li M, Wang D, He J, Chen L, Li H. (2020) Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. *Pharmacol Res*, 151:104547.
- Liberio SA, Pereira ALA, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJA, Mattar NS, Monteiro-Neto V. (2011) Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects

and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. BMC Complement Altern Med, 11:1-10.

Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res, 674(1-2):137-147.

Lindqvist PG, Epstein E, Landin-Olsson M. (2022) Sun exposure-hazards and benefits. Anticancer Res, 42(4):1671-1677.

Liskova A, Koklesova L, Samec M, Smejkal K, Samuel SM, Varghese E, Abotaleb M, Biringier K, Kudela E, Danko J, Shakibaei M, Kwon TK, Busselberg D, Kubatka P. (2020) Flavonoids in cancer metastasis. Cancers, 12(6):1498.

Liu-Smith F, Jia J, Zheng Y. (2017) UV-induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. In: Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment, pp. 27-40.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev, 4(8):118.

Loeb LA, Harris CC. (2008) Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. Cancer Res, 68(17):6863-6872.

Long NA, Golla U, Sharma A, Claxton DF. (2022) Acute myeloid leukemia stem cells: origin, characteristics, and clinical implications. Stem Cell Rev Rep, 18(4):1211-1226.

Lopez LR, Bleich RM, Arthur JC. (2021) Microbiota effects on carcinogenesis: initiation, promotion, and progression. Annu Rev Med, 72:243-261.

Loreto C, La Rocca G, Anzalone R, Caltabiano R, Vespasiani G, Castorina S, Ralph DJ, Celtek S, Musumeci G, Giunta S, Djinovici R, Basic D, Sansalone S. (2014) The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. Biomed Res Int, 2014.

Losson H, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. (2020) HDAC6—An Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia?. Cancers, 12(2):318.

Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. (2017) Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. Nat Rev Clin Oncol, 14(8):463-482.

Lushchak VI. (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact, 224:164-175.

Magnusson WE, Grelle CE, Marques M, Rocha CF, Dias B, Fontana CS, Bergallo H, Overbeck GE, Vale MM, Tomas WM, Cerqueira R, Collevatti R, Pillar VD, Malabarba LR, Lins-e-Silva AC, Neckel-Oliveira S, Martinelli B, Akama A, Rodrigues D, Silveira LF, Scariot A, Fernandes GW. (2018) Effects of Brazil's political crisis on the science needed for biodiversity conservation. Front Ecol Evol, 6:163.

Maia SB, Rolland Souza AS, Costa Caminha MDF, Lins da Silva S, Callou Cruz RDSBL, Carvalho dos Santos C, Batista Filho M. (2019) Vitamin A and pregnancy: a narrative review. Nutrients, 11(3):681.

Maisonneuve E, Ducret A, Khoeiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, Dukan S. (2009) Rules governing selective protein carbonylation. PLoS One, 4(10).

- Malard F, Mohty M. (2020) Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 395(10230):1146-1162.
- Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J, Jiang WG. (2013) Cancer invasion and metastasis: molecular and cellular perspective. *Madame Curie Bioscience Database*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>. Acesso em: abril de 2021.
- Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, Rui M, Siciliano AM, Collina S. (2018) Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett*, 28(17):2816-2826.
- Maru GB, Gandhi K, Ramchandani A, Kumar G. (2014) The role of inflammation in skin cancer. In: *Inflammation and Cancer*, pp. 437-469.
- Matos J, Cardoso C, Gomes A, Campos AM, Falé P, Afonso C, Bandarra NM. (2019) Bioprospection of *Isochrysis galbana* and its potential as a nutraceutical. *Food Funct*, 10(11):7333-7342.
- McLaughlin CC, Wu XC, Jemal A, Martin HJ, Roche LM, Chen VW. (2005) Incidence of noncutaneous melanomas in the US. *Cancer*, 103(5):1000-1007.
- MedlinePlus. (2018) Trust Health Information for You. ASXL1 Gene. Available at: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/asxl1/> [Accessed April 2021].
- Meirson T, Gil-Henn H, Samson AO. (2020) Invasion and metastasis: The elusive hallmark of cancer. *Oncogene*, 39(9):2024-2026.
- Mendes-Silva TDC, da Silva Andrade RF, Ootani MA, Mendes PVD, da Silva MRF, Souza KS, Correia MTS, Silva MV, de Oliveira MBM. (2020) Biotechnological potential of carotenoids produced by extremophilic microorganisms and application prospects for the cosmetics industry. *Adv Microbiol*, 10(8):397-410.
- Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, Andreeff M, Krause DS. (2020) Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*, 20(5):285-298.
- Menezes R, Foito A, Jardim C, Costa I, Garcia G, Rosado-Ramos R, Freitag S, Alexander CJ, Outeiro TF, Stewart D, Santos CN. (2020) Bioprospection of natural sources of polyphenols with therapeutic potential for redox-related diseases. *Antioxidants*, 9(9):789.
- Miller AJ, Mihm Jr MC. (2006) Melanoma. *N Engl J Med*, 355(1):51-65.
- Miller MA, Zachary JF. (2017) Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation, and death. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 2. ed.
- Minciacchi VR, Kumar R, Krause DS. (2021) Chronic myeloid leukemia: a model disease of the past, present and future. *Cells*, 10(1):117.
- Ministério do Meio Ambiente. O bioma Cerrado. 2024a. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biomas/cerrado#:~:text=O%20Bioma%20Cerrado,de%202%25%20do%20territ%C3%B3rio%20nacional>. Acesso em: janeiro de 2021.
- Ministério do Meio Ambiente. Fauna e Flora, 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora>. Acesso em: setembro de 2020.

Ministério Público de Mato Grosso. (2019) Porque Mato Grosso possui tanta biodiversidade? Disponível em: <[https://pjedaou.mpmt.mp.br/biodiversidade-mato-grosso/#:~:text=Mato%20Grosso%20possui%20vasta%20extens%C3%A3o,\(bacia%20do%20Rio%20Paraguai\)](https://pjedaou.mpmt.mp.br/biodiversidade-mato-grosso/#:~:text=Mato%20Grosso%20possui%20vasta%20extens%C3%A3o,(bacia%20do%20Rio%20Paraguai).)>. Acessado em: janeiro de 2024.

Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. (2018) Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*, 63(1):68-78.

Mittal V. (2018) Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. *Annu Rev Pathol: Mech Dis*, 13:395-412.

Mittler R. (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci*, 22(1):11-19.

Mohr KI. (2016) History of antibiotics research. In: *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, p. 237-272.

Mollaei M, Hassan ZM, Khorshidi F, Langroudi L. (2021) Chemotherapeutic drugs: cell death-and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? *Transl Oncol*, 14(5):101056.

Monteiro-Alfredo T, Matafome P, Iacia BP, Antunes KÁ, dos Santos JM, da Silva Melo da Cunha J, Oliveira AS, Campos JF, Magalhães M, Cabral C, Seica R, Cardoso CAL, Oliveira CFR, dos Santos EL, de Picoli Souza K. (2020) *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. Leaves increase SIRT1 levels and improve stress resistance. *Oxid Med Cell Longev*, 2020.

Morshed MN, Ahn JC, Mathiyalagan R, Rupa EJ, Akter R, Karim MR, Jung SK. (2023) Antioxidant Activity of *Panax ginseng* to Regulate ROS in Various Chronic Diseases. *Appl Sci*, 13(5):2893.

Moussa Z, Judeh ZM, Ahmed SA. (2019) Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. In: *Free Radical Medicine and Biology*. Rijeka, Croatia: IntechOpen.

My Cancer Genome. Melanoma. 2021a. Disponível em: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/melanoma/>. Acesso em: abril de 2021.

My Cancer Genome. Chronic myeloid leukemia. 2021b. Disponível em: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/chronic-myeloid-leukemia/>. Acesso em: abril de 2021.

Nangia J, Wang T, Osborne C, Niravath P, Otte K, Papish S, Paxman R. (2017) Effect of a scalp cooling device on alopecia in women undergoing chemotherapy for breast cancer: the SCALP randomized clinical trial. *JAMA*, 317:596-605.

National Cancer Institute. Stem Cell Transplants in Cancer Treatment. 2015. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/stem-cell-transplant>. Acesso em: abril de 2021.

National Cancer Institute. Radiation Therapy to Treat Cancer. 2019a. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>. Acesso em: abril de 2021.

National Cancer Institute. Immunotherapy to Treat Cancer. 2019b. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>. Acesso em: abril de 2021.

National Geographic Society. (2021) Biodiversity. Disponível em: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/biodiversity/> Acesso em: junho de 2021.

National Institute of Health. (2020) Metastatic cancer: When cancer spreads. Available at: NIH Link.

Newman DJ, Cragg GM. (2017) Current status of marine-derived compounds as warheads in anti-tumor drug candidates. *Mar Drugs*, 15(4):99.

Newman DJ, Cragg GM. (2020) Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, 83(3):770-803.

Nimse SB, Pal D. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*, 5(35):27986-28006.

Nirmala JG, Lopus M. (2020) Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol*, 36(2):145-164.

Nobili S, Lapucci A, Landini I, Cornello M, Roviello G, Mini E. (2020) Role of ATP-binding cassette transporters in cancer initiation and progression. In: *Semin Cancer Biol*. Academic Press, 60:72-95.

Nogueira DS. (2023) Overview of Stingless Bees in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Entomobrasilis*, 16: e1041-e1041.

Nogueira-Neto P. (1997) Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. 1. ed. São Paulo: Edição Nogueirapis, 447 p.

Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. (2020) Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol*, 37:101674.

Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. (2009) Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood*, 113(16):3655-3665.

O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, et al. (2012) Acute myeloid leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*, 10(8):984-1021.

Obeng E. (2020) Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*, 81:1133-1143.

Ogun AS, Adeyinka A. (2021) Biochemistry, Transferrin. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532928/> Acesso em: abril de 2021.

Oliveira LPG, Conte FL, Cardoso EDO, Conti BJ, Santiago KB, Golim MDA, Sforcin JM. (2016) Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. *J Pharm Pharmacol*, 68(12):1551-1558.

Oliveira LPG, Conte FL, de Oliveira Cardoso E, Conti BJ, Santiago KB, de Assis Golim M, Feltran GDS, Zambuzzi WF, Sforcin JM. (2019) A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. *Life Sci*, 217:81-90.

Ong YS, Tan LT. (2020) Cancer, natural products and nanodrug delivery systems. *Prog Microbes Mol Biol*, 3(1).

Opdenbosch NV, Lamkanfi M. (2019) Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*, 50(6):1352-1364.

Organização Mundial da Saúde. (2023) World Health Organization. Cancer. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, acessado em: outubro de 2023.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 460(1):72-81.

Orzalli MH, Kagan JC. (2017) Apoptosis and necroptosis as host defense strategies to prevent viral infection. *Trends Cell Biol*, 27(11):800-809.

Otasevic V, Stancic A, Orac A, Jankovic A, Korac B. (2020) Reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species in human male fertility. A crossroad of cellular signaling and pathology. *Biofactors*, 46(2):206-219.

Pacheco AG, Krohling RA. (2020) The impact of patient clinical information on automated skin cancer detection. *Comput Biol Med*, 116:103545.

Padma VV. (2015) An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, 5(4):1-6.

Paiva RKA, Salatino A, Negri G, Palacios Jara CE, Araújo Júnior HND, Costa KMDFM, Batista JS. (2023) Composition and hepatoprotective effect of geopropolis of *Melipona subnitida*. *F1000Res*, 12:999.

Pan ST, Li ZL, He ZX, Qiu JX, Zhou SF. (2016) Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 43(8):723-737.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, Potter NE, Heuser M, Thol F, Bolli N, Gundem G, Loo PV, Martincorena I, Ganly P, Mudie L, McLaren S, O'Meara S, Raine K, Jones DR, Teague JW, Butler AP, Greaves MF, Ganser A, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Campbell PJ. (2016) Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 374(23):2209-2221.

Partridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoyer D. (2016) An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today*, 21(2):204-207.

Patil K, Guledgud MV, Kulkarni PK, KeShari D, Tayal S. (2015) Use of curcumin mouthrinse in radio-chemotherapy induced oral mucositis patients: a pilot study. *J Clin Diagn Res*, 9(8).

Pedone E, Fiorentino G, Bartolucci S, Limauro D. (2020) Enzymatic Antioxidant Signatures in Hyperthermophilic Archaea. *Antioxidants*, 9(8):703.

Pedro SR. (2014) The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61(4):348-354.

Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, Psaila B, Kaplan RN, Bromberg JF, Kang Y, Bissell MJ, Cox TR, Giaccia AJ, Erler JT, Hiratsuka S, Ghajar CM, Lyden D. (2017) Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer*, 17(5):302-317.

Pfeffer CM, Singh AT. (2018) Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*, 19(2):448.

Pfeifer GP. (2020) Mechanisms of UV-induced mutations and skin cancer. *Genome Instab Dis*, 1(3):99-113.

- Pílón AC, Valli M, Dametto AC, Pinto MEF, Freire RT, Castro-Gamboa I, Andricopulo AD, Bolzani VS. (2017) NuBBE DB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. *Sci Rep*, 7(1):1-12.
- Pimentel TC, Rosset M, de Sousa JMB, de Oliveira LIG, Mafaldo IM, Pintado MME, Magnani M. (2022) Stingless bee honey: An overview of health benefits and main market challenges. *J Food Biochem*, 46(3).
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Bitto A. (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017.
- Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. (2018) The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front Oncol*, 8:431.
- Popova M, Trusheva B, Bankova V. (2019) Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. *Phytomedicine*, 153098.
- Popper H. (2020) Primary tumor and metastasis—sectioning the different steps of the metastatic cascade. *Transl Lung Cancer Res*, 9(5):2277.
- Portal AS, Schiquet dos Santos S, Amaral BP, Krepsky LM, Curbani L, Rebelo RA, de Cordova CM. (2023) Composition, antibiofilm, and antibacterial potential of volatile oils from geopropolis of different stingless bees' species. *Chem Biodivers*, e202300592.
- PubMed Database in National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023) Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=geopropolis>. Acesso em: 07 de setembro de 2023.
- Purohit J, Chattopadhyay A, Biswas MK, Singh N. (2018) Mycoremediation of agricultural soil: bioprospection for sustainable development. *Mycoremediation Environ Sustain*, 2:91-120.
- Ranneh Y, Ali F, Akim AM, Hamid HA, Khazaai H, Fadel A. (2017) Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review. *Appl Biol Chem*, 60(3):327-338.
- Rasool M, Farooq S, Malik A, Shaukat A, Manan A, Asif M, Sani S, Qazi MH, Kamal MA, Iqbal Z, Hussain A. (2015) Assessment of circulating biochemical markers and antioxidative status in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) patients. *Saudi J Biol Sci*, 22(1):106-111.
- Ravindranathan P, Pasham D, Goel A. (2019) Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) from grape seed extract suppress the activity of ABC transporters in overcoming chemoresistance in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 40(3):412-421.
- Rawla P, Sunkara T, Gadupati V. (2019) Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors. *World J Oncol*, 10(1):10.
- Reis MA, Matos AM, Duarte N, Ahmed OB, Ferreira RJ, Lage H, Ferreira MJU. (2020) Epoxyalthyrane derivatives as MDR-selective compounds for disabling multidrug resistance in cancer. *Front Pharmacol*, 11:599.
- Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. (2013) Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*, 13(12):858-870.

- Ribeiro J, Colli GR, Soares AM. (2020) The anurofauna of a vanishing savanna: the case of the Brazilian Cerrado. *Biodivers Conserv*, 29(6):1993-2015.
- Ribeiro-Júnior JA, Franchin M, Cavallini ME, Denny C, Alencar SMD, Ikegaki M, Rosalen PL. (2015) Gastroprotective effect of geopropolis from *Melipona scutellaris* is dependent on production of nitric oxide and prostaglandin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015.
- Ricci MS, Zong WX. (2006) Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*, 11(4):342.
- Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. (2019) Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*, 18(3):175-196.
- Ritchie H, Roser M. (2018) Causes of Death. Published online at OurWorldInData.org. Disponível em: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>. Acesso em: janeiro de 2021.
- Rocha VM, Portela RD, dos Anjos JP, de Souza CO, Umsza-Guez MA. (2023) Stingless bee propolis: composition, biological activities and its applications in the food industry. *Food Prod Process Nutr*, 5(1):1-13.
- Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. (2017) Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun*, 8(1):1-14.
- Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. (2008) Acute myeloid leukemia. *Pediatr Clin North Am*, 55(1):21-51.
- Ruysscher D, Niedermann G, Burnet NG, Siva S, Lee AW, Hegi-Johnson F. (2019) Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1):1-20.
- Sachet M, Liang YY, Oehler R. (2017) The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, 22(10):1189-1204.
- Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K, Yang GM, Dayem AA, Cho SG. (2017) Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *Int J Mol Sci*, 18(7):1544.
- Sairazi NSM, Sirajudeen KNS. (2020) Natural products and their bioactive compounds: neuroprotective potentials against neurodegenerative diseases. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020.
- Sandamali JA, Hewawasam RP, Jayatilaka KA, Mudduwa LK. (2020) Cardioprotective potential of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. leaf extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020:6023737.
- Santabarbara G, Maione P, Rossi A, Gridelli C. (2015) Pharmacotherapeutic options for treating adverse effects of Cisplatin chemotherapy. *Expert Opin Pharmacother*, 17(4):561-570.
- Santos HFD, Campos JF, Santos CMD, Balestieri JBP, Silva DB, Carollo CA, de Picoli Souza K, Estevinho LM, dos Santos EL. (2017a) Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *Int J Mol Sci*, 18(5):953.
- Santos CM, Campos JF, dos Santos HF, Balestieri JBP, Silva DB, de Picoli Souza K, Carollo CA, Estevinho LM, dos Santos EL. (2017b) Chemical composition and

pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017.

Santos TLD, Queiroz RF, Sawaya AC, Lopez BGC, Soares MB, Bezerra DP, Waldschmidt AM. (2017c) *Melipona mondury* produces a geopropolis with antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities. *An Acad Bras Cienc*, 89(3 Suppl):2247-2259.

Santos JM, Alfredo TM, Antunes KÁ, da Cunha JDS, Costa EMA, Lima ES, Santos ED, Souza KP. (2018) *Guazuma ulmifolia* Lam. decreases oxidative stress in blood cells and prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*, 2018.

Santos MO, Lima FCDS, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM, Camargo Cancela ME. (2023) Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. *Rev Bras Cancerol*, 69(1).

Santos UP, Tolentino GS, Morais JS, de Picoli Souza K, Estevinho LM, dos Santos EL. (2018) Physicochemical characterization, microbiological quality and safety, and pharmacological potential of *Hancornia speciosa* Gomes. *Oxid Med Cell Longev*, 2018.

Sardeli C, Zarogoulidis P, Kosmidis C, Amaniti A, Katsaounis A, Giannakidis D, Koulouris C, Hohenforst-Schmidt W, Huang H, Bai C, Michalopoulos N, Tsakiridis K, Romanidis K, Oikonomou P, Mponiou K, Vagionas A, Gogana A M, Kesisoglou I, Sapalidis K. (2020) Inhaled chemotherapy adverse effects: mechanisms and protection methods. *Lung Cancer Manag*, 8(4):LMT19.

Sarmiento A, Diaz-Castro J, Pulido-Moran M, Kajarabille N, Guisado R, Ochoa J. (2016) Coenzyme Q10 supplementation and exercise in healthy humans: a systematic review. *Curr Drug Metab*, 17(4):345-358.

Sauler M, Bazan IS, Lee PJ. (2019) Cell death in the lung: the apoptosis–necroptosis axis. *Annu Rev Physiol*, 81:375-402.

Saultz JN, Garzon R. (2016) Acute myeloid leukemia: a concise review. *J Clin Med*, 5(3):33.

Savant SS, Sriramkumar S, O'Hagan HM. (2018) The role of inflammation and inflammatory mediators in the development, progression, metastasis, and chemoresistance of epithelial ovarian cancer. *Cancers*, 10(8):251.

Sawarkar A, Sharma RK, Gautam V. (2019) Bioprospecting: creating value for biodiversity. *The Pharma Innov J*, 8(4):256-265.

Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A, Hauschild A. (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Primers*, 1(1):1-20.

Schieber M, Chandel NS. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24(10).

Schwab M. (2017) *Encyclopedia of cancer*. Springer.

Schwabe RF, Luedde T. (2018) Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(12):738-752.

Sepúlveda C, Núñez O, Torres A, Guzmán L, Wehinger S. (2019) Antitumor activity of propolis: recent advances in cellular perspectives, animal models and possible applications. *Food Rev Int*, 36(5):429-455.

- Seven PT, Seven I, Karakus S, Iflazoglu Mutlu S, Arkali G, Muge Sahin Y, Kilislioglu A. (2020) Turkish propolis and its nano form can ameliorate the side effects of cisplatin, which is a widely used drug in the treatment of cancer. *Plants*, 9(9):1075.
- Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. (2019) Epidemiology of acute myeloid leukemia: recent progress and enduring challenges. *Blood Rev*, 36:70-87.
- Sharf G, Marin C, Bradley JA, Pemberton-Whiteley Z, Bombaci F, Christensen RI, Gouimi B, Deekes NB, Daban M, Geissler J. (2020) Treatment-free remission in chronic myeloid leukemia: the patient perspective and areas of unmet needs. *Leukemia*, 34(8):2102-2112.
- Sharma V, Collins LB, Chen TH, Herr N, Takeda S, Sun W, Swenberg JA, Nakamura J. (2016) Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*, 7(18):25377.
- Sharma GN, Gupta G, Sharma P. (2018) A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 28(2).
- Shen B. (2015) A new golden age of natural products drug discovery. *Cell*, 163(6):1297-1300.
- Shi DD, Dong CM, Ho LC, Lam CTW, Zhou XD, Wu EX, et al. (2018) Resveratrol, a natural polyphenol, prevents chemotherapy-induced cognitive impairment: Involvement of cytokine modulation and neuroprotection. *Neurobiol Dis*, 114:164-173.
- Shi T, Dansen TB. (2020) Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxid Redox Signal*, 33(12):839-859.
- Shields HJ, Traa A, Van Raamsdonk JM. (2021) Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review of comparative and experimental studies. *Front Cell Dev Biol*, 9:181.
- Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. (2015) Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann NY Acad Sci*, 1348(1):20-31.
- Sies H, Jones DP. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signaling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(7):363-383.
- Silva MT. (2010) Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett*, 584(22):4491-4499.
- Silva ECCD, Muniz MP, Nunomura RDC, Nunomura SM, Zilse GAC. (2013) Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Quím Nova*, 36:628-633.
- Simone-Finstrom M, Spivak M. (2010) Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3):295-311.
- Sinbad OO, Folorunsho AA, Olabisi OL, Ayoola OA, Temitope EJ. (2019) Vitamins as antioxidants. *J Food Sci Nutr Res*, 2(3):214-235.
- Singh R, Letai A, Sarosiek K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(3):175-193.
- Siqueira JS, Mescouto CST, Lemos MDS, Junior JBP, Ventureri GC, Filho HAD, Dantas KDGF. (2020) Determination of inorganic elements in geopropolis samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J Apicult Res*, 1-8.

Skin Cancer Foundation. (2021) Skin Cancer 101. Disponível em: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/>. Acesso em: abril de 2021.

Slaa EJ, Chaves LAS, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE. (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37(2):293-315.

Smeda M, Przyborowski K, Stojak M, Chlopicki S. (2020) The endothelial barrier and cancer metastasis: Does the protective facet platelet function matter? *Biochem Pharmacol*, 176:113886.

Smith HA, Kang Y. (2013) The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med*, 91(4):411-429.

Sociedade Brasileira de Cancerologia. (2024) Sobre o Câncer. Conheça os principais tipos de tratamento de câncer. Disponível em: SBC Link.

Sommer A. (2001) Vitamin A Deficiency. *Encycl Life Sci*.

Sorokina M, Steinbeck C. (2020) Review on natural products databases: where to find data in 2020. *J Cheminformatics*, 12(1):1-51.

Sousa-Fontoura DM, Olinda RG, Viana GA, de FM Costa KM, Batista JS, Serrano RM, Silva OMOD, Camara CA, Silva TMW. (2020) Wound healing activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona subnitida*. *Rev Bras Farmacogn*, 30:367-373.

Souza RC, Paiva LKOYJ, Aguiar L, Plácido F, Oliveira M. (2004) Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazon*, 34(2):333-336.

Souza SA, Camara CA, Silva EMS, Silva TMS. (2013) Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:1-5.

Souza SA, da Silva TMG, da Silva EMS, Camara CA, Silva TMS. (2018) Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). *Phytochem Anal*, 29(6):549-558.

Srinivas US, Tan BW, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. (2019) ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*, 25:101084.

Strassburg BB, Brooks T, Feltran-Barbieri R, Iribarrem A, Crouzeilles R, Loyola R, Latawiec AE, Filho FJB, Scaramuzza CADM, Scarana FR, Soares-Filho B, Balmford A. (2017) Moment of truth for the Cerrado hotspot. *Nat Ecol Evol*, 1(4):1-3.

Stringfellow HM, Jones MR, Green MC, Wilson AK, Francisco JS. (2014) Selectivity in ROS-induced peptide backbone bond cleavage. *J Phys Chem A*, 118(48):11399-11404.

Suhaili SH, Karimian H, Stellato M, Lee TH, Aguilar MI. (2017) Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization. *Biophys Rev*, 9(4):443-457.

Sukhotnik I, Moati D, Shaoul R, Loberman B, Pollak Y, Schwartz B. (2018) Quercetin prevents small intestinal damage and enhances intestinal recovery during methotrexate-induced intestinal mucositis of rats. *Food Nutr Res*, 62.

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3):209-249.
- Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. (2010) Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal*, 12(3):323-325.
- Tan S, Li D, Zhu X. (2020) Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother*, 124:109821.
- Tas F, Keskin S, Karadeniz A, Dağoğlu N, Sem F, Kılıç L, Yıldız I. (2011) Noncutaneous melanoma have distinct features from each other and cutaneous melanoma. *Oncol*, 81(5-6):353-358.
- Tebbi CK. (2021) Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers*, 13(9):2256.
- Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, ... & Meier P. (2011) The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell*, 43(3):432-448.
- Terwilliger T, Abdul-Hay MJBCJ. (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J*, 7(6).
- The Canadian CML Network. (2021) Understanding CML. Available at: <https://cmlnetwork.ca/i-have-cml-now-what/>. Accessed March 2021.
- Tian B, Hua S, Liu J. (2020) Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review. *Carbohydr Polym*, 232:115805.
- Tirichen H, Yaigoub H, Xu W, Wu C, Li R, Li Y. (2021) Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution in chronic kidney disease progression through oxidative stress. *Front Physiol*, 12:398.
- Toledo-Hernández E, Peña-Chora G, Hernandez-Velazquez VM, Lormendez CC, Toribio-Jiménez J, Romero-Ramírez Y, & León-Rodríguez R. (2022) The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. *Apidologie*, 53(1):8.
- Torres-González A, López-Rivera P, Duarte-Lisci G, López-Ramírez Á, Correa-Benítez A, Rivero-Cruz JF. (2015) Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopolyis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. *Nat Prod Res*, 30(2):237-240.
- Tramutola A, Lanzilotta C, Perluigi M, Butterfield DA. (2017) Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res Bull*, 133:88-96.
- Trosko JE. (2013) Evolution of energy metabolism, stem cells and cancer stem cells: how the Warburg and Barker hypothesis might be linked. *BMC Proc*, 7(2):1-2.
- Ullah R, Khan M, Shah SA, Saeed K, Kim MO. (2019) Natural antioxidant anthocyanins: A hidden therapeutic candidate in metabolic disorders with major focus in neurodegeneration. *Nutrients*, 11(6):1195.
- Ursini F, Maiorino M. (2020) Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med*, 152:175-185.
- Vaccaro A, Dor YK, Nambara K, Pollina EA, Lin C, Greenberg ME, Rogulja D. (2020) Sleep loss can cause death through accumulation of reactive oxygen species in the gut. *Cell*, 181(6):1307-1328.e15.

- Vacchiano MC, Santos JW, Angeoleto F, Silva NM. (2019) Do data support claims that Brazil leads the world in environmental preservation? *Environ Conserv*, 46(2):118-120.
- Valastyan S, Weinberg RA. (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2):275-292.
- Vega MR, Chapman E, Zhang DD. (2018) NRF2 and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell*, 34(1):21-43.
- Vetrie D, Helgason GV, Copland M. (2020) The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. *Nat Rev Cancer*, 20(3):158-173.
- Villas-Bôas JK. (2018) Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas Nativas Sem Ferrão. Brasília - DF: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 2^a ed.
- Vit P, Pedro SR, Roubik D. (2013) Pot-honey: a legacy of stingless bees. Springer Science & Business Media, pp. 1-629.
- Vo PHT, Nguyen TDT, Tran HT, Nguyen YN, Doan MT, Nguyen PH, Lien GTK, To DC, Tran MH. (2021) Cytotoxic components from the leaves of *Erythrophleum fordii* induce human acute leukemia cell apoptosis through caspase 3 activation and PARP cleavage. *Bioorg Med Chem Lett*, 31:127673.
- Wang J, Chen J, Sharma A, Tao S, Zheng B, Landi M, Yuan H, Yan D. (2019) Melatonin stimulates activities and antioxidant level of antioxidant enzymes and preserves functionality of photosynthetic apparatus in hickory plants (*Carya cathayensis* Sarg.) under PEG-promoted drought. *Agronomy*, 9(11):702.
- Wattanathamsan O, Hayakawa Y, Pongrakhananon V. (2019) Molecular mechanisms of natural compounds in cell death induction and sensitization to chemotherapeutic drugs in lung cancer. *Phytother Res*, 33(10):2531-2547.
- Webster RP, Roberts VHJ, Myatt L. (2008) Protein nitration in placenta: functional significance. *Placenta*, 29(12):985-994.
- Wehner MR. (2018) Sunscreen and melanoma prevention: evidence and expectations. *Br J Dermatol*, 178(1):15.
- Welch DR, Hurst DR. (2019) Defining the hallmarks of metastasis. *Cancer Res*, 79(12):3011-3027.
- Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. (2010) Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Infect Dis Clin North Am*, 24(2):257-272.
- Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. (2016) Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annu Rev Biochem*, 85:765-792.
- Wyllie AH. (2010) "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*, 42(1):4-9.
- Xiong YL, Guo A. (2021) Animal and plant protein oxidation: chemical and functional property significance. *Foods*, 10(1):40.
- Xu Y, Ma HB, Fang YL, Zhang ZR, Shao J, Hong M, Chen RQ. (2017a) Cisplatin-induced necroptosis in TNF α dependent and independent pathways. *Cell Signal*, 31:112-123.

- Xu XF, Zhang XB, Zhang Y, Yang L, Liu YC, Huang SL, Zhao L. (2017b) Wogonin reversed resistant human myelogenous leukemia cells via inhibiting Nrf2 signaling by Stat3/NF- κ B inactivation. *Sci Rep*, 7(1):39950.
- Yan M, Jurasz P. (2016) The role of platelets in the tumor microenvironment: from solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 1863(3):392-400.
- Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. (2015) Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil Med Res*, 2(1):1-12.
- Yang S, Lian G. (2020) ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem*, 467(1):1-12.
- Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. (2015) Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subjects*, 1850(8):1607-1621.
- Yeldag G, Rice A, Del Río Hernández A. (2018) Chemoresistance and the self-maintaining tumor microenvironment. *Cancers*, 10(12):471.
- Yi M, Li A, Zhou L, Chu Q, Song Y, Wu K. (2020) The global burden and attributable risk factor analysis of acute myeloid leukemia in 195 countries and territories from 1990 to 2017: estimates based on the Global Burden of Disease Study 2017. *J Hematol Oncol*, 13:1-16.
- Yilmaz M, Atilla FD, Şahin F, Saydam G. (2020) The effect of malnutrition on mortality in hospitalized patients with hematologic malignancy. *Support Care Cancer*, 28(3):1441-1448.
- Yousef MI, Mahdy MA, Abdou HM. (2019) The potential protective role of grape seed proanthocyanidin extract against the mixture of carboplatin and thalidomide-induced hepatotoxicity and cardiotoxicity in male rats. *Prev Med*, 2:1-7.
- Zajączkowska R, Kocot-Kępska M, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J. (2019) Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Int J Mol Sci*, 20(6):1451.
- Zavyalova MV, Denisov EV, Tashireva LA, Savelieva OE, Kaigorodova EV, Krakhmal NV, Perelmuter VM. (2019) Intravasation as a key step in cancer metastasis. *Biochem (Mosc)*, 84(7):762-772.
- Zhang H, Liu L, Wang Y, Zhao G, Xie R, Liu C, Xiao X, Wu K, Nie Y, Zhang H, Fan D. (2013) KLF8 involves in TGF-beta-induced EMT and promotes invasion and migration in gastric cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139(6):1033-1042.
- Zhang J, Lou X, Jin L, Zhou R, Liu S, Xu N, Liao DJ. (2014) Necrosis, and then stress induced necrosis-like cell death, but not apoptosis, should be the preferred cell death mode for chemotherapy: clearance of a few misconceptions. *Oncoscience*, 1(6):407.
- Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. (2018a) Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res*, 28(1):9-21.
- Zhang QY, Wang FX, Jia KK, Kong LD. (2018b) Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Front Pharmacol*, 9:1253.
- Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. (2019) The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther*, 10(1):1-13.

- Zhang N, Cai YX, Wang YY, Tian YT, Wang XL, Badami B. (2020) Skin cancer diagnosis based on optimized convolutional neural network. *Artif Intell Med*, 102:101756.
- Zhao L, Yu M, Sun M, Xue X, Wang T, Cao W, Sun L. (2017) Rapid determination of major compounds in the ethanol extract of geopropolis from Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. *Molecules*, 22(11):1935.
- Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. (2019) Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *Int J Mol Med*, 44(1):3-15.
- Zhong Z, Yu J, Virshup DM, Madan BW. (2020) Wnts and the hallmarks of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 39(3):625-645.
- Zhou QM, Sun Y, Lu YY, Zhang H, Chen QL, Su SB. (2017) Curcumin reduces mitomycin C resistance in breast cancer stem cells by regulating Bcl-2 family-mediated apoptosis. *Cancer Cell Int*, 17:1-13.
- Zhou X, Joshi S, Patil S, Khare T, Kumar V. (2021) Reactive oxygen, nitrogen, carbonyl and sulfur species and their roles in plant abiotic stress responses and tolerance. *J Plant Growth Regul*, 1-24.
- Zulaihkah ST. (2017) The role of antioxidant to prevent free radicals in the body. *Sains Medika*, 8(1):39-45.
- Zulhendri F, Felitti R, Fearnley J, Ravalia M. (2021) The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *J Oral Biosci*, 63(1):23-34.

5. APÊNDICES

5.1. Artigos Científicos

Artigo 1 – Efeito protetor de Geoprópolis de *Melipona orbignyi* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* contra estresse oxidativo e aumento da expectativa de vida de *Caenorhabditis elegans*

A ser submetido na revista “International Journal of Molecular Sciences” (Fator de impacto: 5.2, Qualis A2 para Biotecnologia)

Artigo 2 – Geoprópolis de abelhas sem ferrão inibem a migração celular e induzem a morte de células cancerígenas via apoptose e necroptose

A ser submetido na revista “Frontiers in Pharmacology” (Fator de impacto: 5.6, Qualis A1 para Biotecnologia).

Artigo 1

Efeito protetor de Geoprópolis de *Melipona orbignyi* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* contra estresse oxidativo e aumento da expectativa de vida de *Caenorhabditis elegans*

Helder Freitas dos Santos¹, Jaqueline Ferreira Campos¹, José Benedito Perrela Balestieri¹, Daniel Ferreira Leite¹, Alex de Oliveira Santos¹, Caio Fernando Ramalho de Oliveira², Kely de Picoli Souza¹, Edson Lucas dos Santos¹

¹Grupo de Estudos em Bioprospecção e Biotecnologia Aplicados ao Metabolismo (GEBBAM), Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, CEP: 79.804-970, Dourados, MS, Brasil.

²Instituto Federal do Mato Grosso, Campus Avançado de Guarantã do Norte, MT, Brasil.

Resumo

O estresse oxidativo (EO) é gerado pelo desequilíbrio da homeostase redox, favorecendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO). Elevados níveis de ERO estão associadas ao envelhecimento precoce, bem como à progressão de diversas doenças, como infarto agudo do miocárdio, diabetes, esclerose múltipla, Parkinson, Alzheimer e câncer. Há milênios, moléculas naturais obtidas de fontes vegetais e animais, incluindo os produtos de abelhas, têm sido utilizadas no tratamento de enfermidades. Nesse contexto, investigamos os efeitos dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis produzidas pelas espécies de abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* (EGMO) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ). Para isto, avaliamos a capacidade desses extratos em proteger macromoléculas contra danos oxidativos *in vitro*, além de estudarmos seus efeitos no modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. O EGMO e o EGMQ foram avaliados frente aos danos oxidativos em proteínas e em DNA, induzidos por AAPH, peróxido de hidrogênio e radiação UV, respectivamente. No modelo *C. elegans*, foi investigado o efeito dos extratos através dos ensaios de estresse oxidativo induzido por juglone, estresse térmico e estudos de longevidade. Nossos resultados demonstraram que ambos os extratos reduziram a oxidação de proteínas e a fragmentação do DNA. No modelo *in vivo*, nenhum dos extratos apresentou toxicidade contra *C. elegans*. Observamos ainda que o EGMO e o EGMQ promoveram um aumento na sobrevivência dos nematoides submetidos ao estresse oxidativo e térmico. Além disso, nos ensaios de longevidade, ambos os extratos em todas as concentrações avaliadas, promoveram aumento na expectativa de vida dos nematoides. Em conjunto, estes resultados evidenciam que os extratos de geoprópolis possuem efeito protetor contra danos oxidativos em macromoléculas e promovem o aumento da expectativa de vida de *C. elegans*. A caracterização dos efeitos protetores de ambos os extratos abre caminho para o desenvolvimento de potenciais produtos à base de geoprópolis na prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Produto apícola, Produto biotecnológico, Prevenção, Danos oxidativos, Doenças, Longevidade

1. Introdução

As ERO são moléculas altamente reativas e são geradas como subprodutos do metabolismo celular (Li *et al.*, 2022; Mittler *et al.*, 2022). Em concentrações fisiológicas, as ERO atuam benéficamente, como moléculas sinalizadoras que regulam processos celulares, e conforme seu aumento, podem promover respostas adaptativas e até efeitos deletérios (Sies & Jones, 2020). O equilíbrio entre a geração e neutralização das ERO pelas defesas antioxidantes é responsável por assegurar a homeostase redox celular (Fatma *et al.*, 2023). Contudo, o desequilíbrio entre a sua produção e neutralização desencadeia o estresse oxidativo (EO) (Collin, 2019).

O EO é caracterizado pelo excesso de ERO, desbalanço da homeostase redox e efeitos deletérios sobre células e tecidos (Singh *et al.*, 2019; Remigante & Morabito, 2022). A nível molecular, o EO promove danos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, eventos associados a aceleração do envelhecimento celular e ao desencadeamento de doenças crônicas (Hajam *et al.*, 2022). As doenças crônicas não transmissíveis (DCTN's) incluem as doenças cardiovasculares, respiratórias, diabetes e câncer, e são responsáveis por cerca de 74 % de todas as mortes no mundo (Organização Mundial da Saúde, 2023). Há um consenso que o EO acompanha o surgimento ou o agravamento destas doenças (Forman & Zhang, 2021). Durante o envelhecimento, as ERO geram danos cumulativos e irreversíveis nas células, impedindo seu funcionamento celular adequado e aumentando déficits funcionais no organismo (Chiang *et al.*, 2022; Goh *et al.*, 2023).

Nesta perspectiva, a obtenção de moléculas antioxidantes de origem exógena é essencial para a saúde do organismo, contribuindo para a redução dos efeitos deletérios do EO e prevenção das doenças relacionadas a esta condição. Os produtos naturais são uma fonte imensurável de compostos químicos que podem trazer benefícios a saúde humana, especialmente em relação à ação antioxidante, capaz de neutralizar os efeitos prejudiciais das ERO e prevenir doenças (Fatma *et al.*, 2023). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil e a savana tropical mais rica do mundo, aportando 5% de toda a biodiversidade do planeta (Embrapa, 2023). Este bioma é considerado um hotspot de biodiversidade global e atrai a atenção de pesquisadores que investigam as propriedades farmacológicas de produtos naturais, na busca por moléculas bioativas com potencial antioxidante.

Dentre os produtos naturais, a geoprópolis é um produto elaborado exclusivamente por algumas espécies de abelhas sem ferrão (Nogueira-Neto, 1997), a partir de diferentes ingredientes naturais, como exsudatos de plantas, pólen, cera, secreções mandibulares e terra (Oliveira *et al.*, 2019). Este produto apícola tem obtido destaque nos últimos anos, onde seu

emergente potencial biológico vem sendo demonstrado através de suas propriedades antimicrobiana (Santos *et al.*, 2017a), anti-inflamatória (Franchin *et al.*, 2016), antiviral (Coelho *et al.*, 2015), cicatrizante (Sousa-Fontoura, 2020), anti-leishmaniose (Dutra *et al.*, 2019), anticâncer (Cinegaglia *et al.*, 2013) e antioxidante (Santos *et al.*, 2017b).

Em estudos anteriores, nós evidenciamos as propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antimutagênica e uma potente ação antioxidante contra radicais livres e a peroxidação lipídica, proveniente da geoprópolis das espécies *Melipona orbignyi* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b). Entretanto, estudos que avaliem a ação protetora em macromoléculas *in vitro* e seus efeitos antioxidantes *in vivo* são inexistentes. Neste contexto, nós investigamos o efeito protetor dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) e de *M.q. anthidioides* (EGMQ) contra danos oxidativos em proteínas e DNA. Adicionalmente, avaliamos o efeito dos extratos na proteção contra o estresse oxidativo, o estresse térmico e ainda seus efeitos sobre a modulação da expectativa de vida de *Caenorhabditis elegans*.

2. Material e métodos

2.1. Químicos e reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico, adquiridos da empresa Sigma-Aldrich/Merck (São Paulo, Brasil).

2.2. Obtenção de amostras e preparação dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis

Amostras de geoprópolis produzidas pelas abelhas sem ferrão *M. orbignyi* e *M. q. anthidioides* (Cadastro SISGEN N°AF5168A) foram identificadas e obtidas pelo biólogo Prof. Dr. José Benedito Perrela Balestieri, em um meliponário no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (22°13'12''S e 54°49'2''O). Para preparação dos extratos, as amostras de geoprópolis foram maceradas com almofariz e pistilo e homogeneizadas com etanol 70%, na proporção de 1:3 (p/v). Em seguida, as soluções foram mantidas em uma incubadora shaker sob agitação moderada, sem presença de luz, durante 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram filtradas em papel filtro qualitativo 80 g/m² (ProLab, São Paulo, Brasil), concentradas em evaporador rotativo a vácuo (Gehaka, São Paulo, Brasil) e liofilizadas, obtendo-se assim os extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) e de *M. q. anthidioides* (EGMQ). O rendimento dos extratos liofilizados foi de 14,9% para EGMO e de 6,0 % para EGMQ, obtidos pela fórmula:

$$\text{Rendimento da extração (\%)} = \frac{\text{amostra liofilizada} \times 100}{\text{amostra original}}$$

Os extratos obtidos foram mantidos à temperatura de -20°C e protegidos da luz, até a realização das análises.

2.3. Ensaio de proteção em macromoléculas

2.3.1. Ensaio de oxidação de proteínas

O efeito dos extratos frente a oxidação de proteínas foi avaliado através do ensaio de indução oxidativa em albumina sérica bovina (BSA) por meio de AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidroclorídrico). Em microtubos, foram incubados 15 μL de BSA (3 mg/mL), juntamente com 15 μL de EGMO ou EGMQ, em diferentes concentrações (12,5 – 250 $\mu\text{g/mL}$) durante 30 min. Posteriormente, 15 μL da solução de AAPH (75 mM) foi adicionada em cada microtubo, seguida de incubação durante 120 min a 37°C . Em seguida, as amostras foram misturadas com 75 μL de tampão de amostra (40% de glicerol, 8% de SDS, 0,25 mM de Tris-HCl pH 6,8; 20% de β -mercaptoetanol, 0,01% de azul de bromofenol) e aquecidas a 100°C durante 3 min. Após isto, as amostras foram aplicadas em géis de eletroforese (SDS-PAGE 12%). O processo de eletroforese foi realizado utilizando o sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) a 200 V durante 60 min e os géis foram digitalizados no fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad Laboratories). A média de quatro géis obtidos em um experimento independente foi realizada para obtenção dos dados.

2.3.2. Ensaio de danos oxidativos induzidos em DNA

O efeito do EGMO e EGMQ contra danos oxidativos induzidos no DNA foi investigado pela fragmentação oxidativa induzida peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e luz ultravioleta (UV). Para isto, o DNA plasmidial (pcDNA 3.1) (50 ng/ μL) em solução de PBS 1x, foi incubado com diferentes concentrações de EGMO/EGMQ (12,5 – 250 $\mu\text{g/mL}$) e H_2O_2 30%, durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas em transiluminador UVT-312 a 302 nm, em temperatura ambiente por 5 min, seguido de aplicação e eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (10 ng/mL). Como controles, amostras de DNA plasmidial também foram incubadas com os antioxidantes padrão quercetina (Q) e ácido gálico (AG) (250 $\mu\text{g/mL}$) e submetidas ao mesmo tratamento. Posteriormente, o gel foi digitalizado pelo fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad Laboratories) e a análise foi realizada com o software Image Lab (Kumar & Chattopadhyay, 2007). Foram realizados dois experimentos

independentes em duplicata e os gráficos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

2.4. Ensaios *in vivo* utilizando o modelo *Caenorhabditis elegans*

2.4.1. Criação e manutenção de *C. elegans*

Para a realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados nematoides tipo selvagem N2 Bistol obtidos do *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), (Minnesota), EUA. Os nematoides foram mantidos em estufa incubadora a 20 °C, cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura para crescimento *Nematode Growth Medium* (NGM) e alimentados com bactérias *Escherichia coli* (OP50). As bactérias utilizadas como alimento para os animais foram inativadas com o antibiótico canamicina (10 mM). Para realização dos experimentos, a cultura de nematoides foi sincronizada, utilizando hipoclorito de sódio 2% e NaOH 5 M. Os ovos resistentes à lise alcalina foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio NGM e *E.coli*.

2.4.2. Avaliação da toxicidade aguda

Para avaliar o efeito tóxico da exposição aguda do EGMO e EGMQ, em média 10 nematoides *C. elegans*, sincronizados em fase L4, foram transferidos para microplacas de 96 poços contendo 100 µL de meio de cultura M9 e 100 µL dos respectivos extratos em diferentes concentrações (12,5 a 250 µg/mL). Posteriormente, os nematoides foram incubados a 20 °C por 24 e 48 h. Como controle negativo, os nematoides foram incubados apenas com 200 µL de meio de cultura M9. Após o período de incubação, a viabilidade foi avaliada pela sensibilidade ao toque com auxílio de um fio de platina. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

2.4.3. Proteção contra o estresse oxidativo induzido por Juglone

Para avaliar os efeitos do EGMO e do EGMQ frente ao estresse oxidativo, os nematoides *C. elegans* selvagens foram expostos ao agente oxidante Juglone (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) (Sobeh *et al.*, 2018). Após a sincronização, em média 10 nematoides em estágio L4 foram acondicionados em poços contendo 100 µL do meio de cultura M9. Em seguida, os nematoides foram pré-incubados com 100 µL de diferentes concentrações (12,5 a 250 µg/mL) de EGMO/EGMQ por 1 h. Posteriormente, o indutor de estresse oxidativo Juglone foi adicionado nos poços contendo os nematoides e os tratamentos, seguida de incubação a 20 °C por 24 h. Nematoides incubados apenas com meio de cultura M9 (250 µL) e com juglone (200 µL de meio M9 + 50 µL de juglone) foram utilizados como controles negativo e positivo para

o dano oxidativo, respectivamente. Após o período de incubação, a viabilidade dos nematoides foi avaliada pela sensibilidade ao toque com auxílio de um fio de platina. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

2.4.4. Proteção contra o estresse térmico

Para avaliar o efeito sobre o estresse térmico, os nematoides N2 foram sincronizados em estágio L4 e tratados com EGMO/EGMQ (12,5 - 250 µg/mL). Para isto, 10 nematoides foram transferidos para novas placas contendo meio NGM, *E. coli* OP50 e os respectivos tratamentos. O estresse térmico foi induzido pelo aumento da temperatura da cultura de 20 para 37 °C durante um período de 6 h, com avaliações realizadas em intervalos de 1 h. Após o período de incubação, os nematoides foram mantidos a 20 °C por 16 h. Este procedimento permite que os nematoides viáveis se recuperem e sejam contados através do toque com auxílio de um fio de platina. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

2.4.5. Ensaio de longevidade

Para avaliar o efeito sob a expectativa de vida, os nematoides N2 sincronizados em estágio L4 foram tratados com EGMO/EGMQ. No primeiro dia da fase adulta, 10 nematoides por grupo foram transferidos para novas placas de Petri contendo *E. coli* OP50 com ou sem a presença do EGMO/EGMQ em diferentes concentrações (12,5; 50; 200 e 250 µg/mL), sendo considerado este o primeiro dia do experimento. Nos primeiros seis dias, os nematoides foram transferidos diariamente para novas placas contendo seus respectivos tratamentos, período em que os animais se encontravam em estágio reprodutivo. A partir do sexto dia, os animais foram transferidos a cada 2 dias. A sobrevivência foi avaliada através da classificação dos animais (mortos/vivos) diariamente, até que todos os nematoides morressem. Foram considerados mortos os animais que não se movimentaram após leve estímulo com fio de platina. Nematoides com ovos eclodidos internamente ou não encontrados foram excluídos da análise. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

2.5. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando o teste *t* de Student para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett para comparação de dois ou mais grupos usando o software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

3. Resultados

3.1. Ensaio de oxidação de proteínas

Inicialmente, o controle positivo AAPH promoveu 100% de oxidação do BSA, por outro lado, os resultados demonstram que ambos EGMO e EGMQ apresentaram efeito protetor, promovendo a redução da oxidação da BSA em todas as concentrações avaliadas. A figura 1A-B, apresenta a redução da difusão das bandas de acordo com o aumento das concentrações. O EGMO apresentou redução de $31,7 \pm 1,77\%$ e de $99,3 \pm 0,59\%$ nas concentrações de 12,5 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 1A). O EGMQ apresentou atividade mais acentuada, promovendo uma redução de $36,4 \pm 3,25\%$ na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, e 100% de redução contra os danos oxidativos nas concentrações de 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1B).

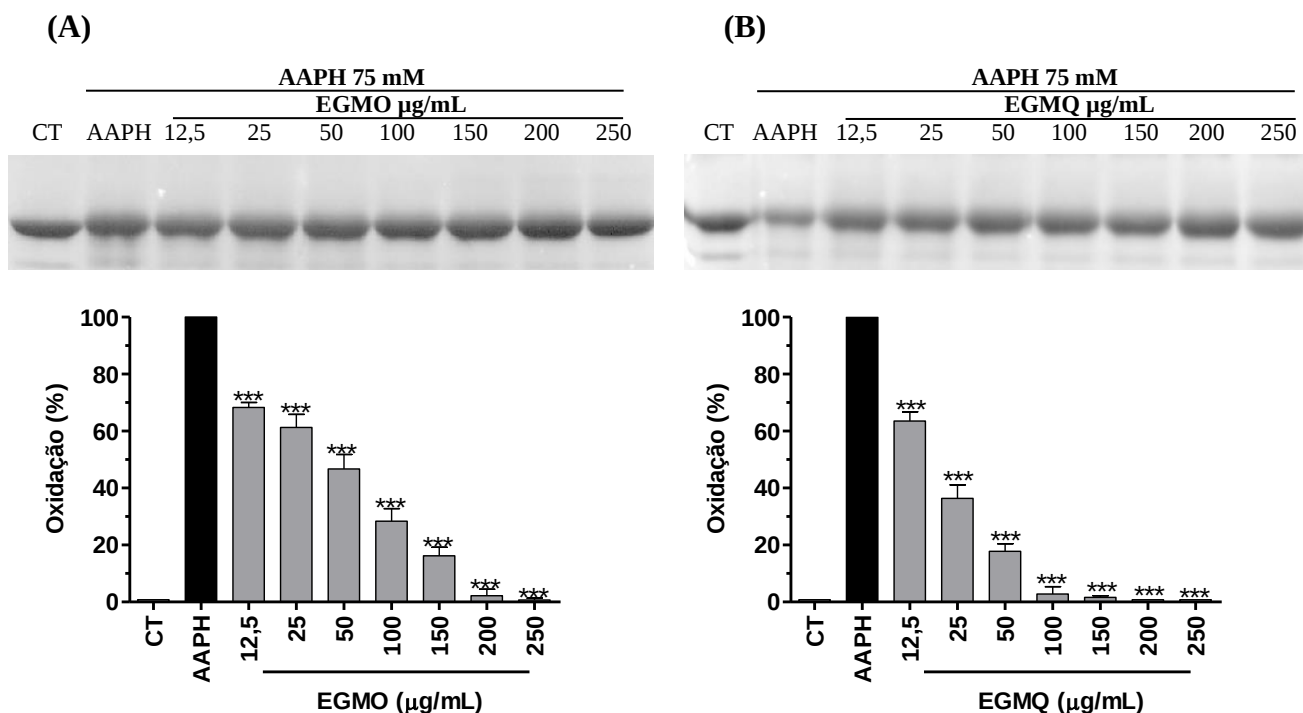


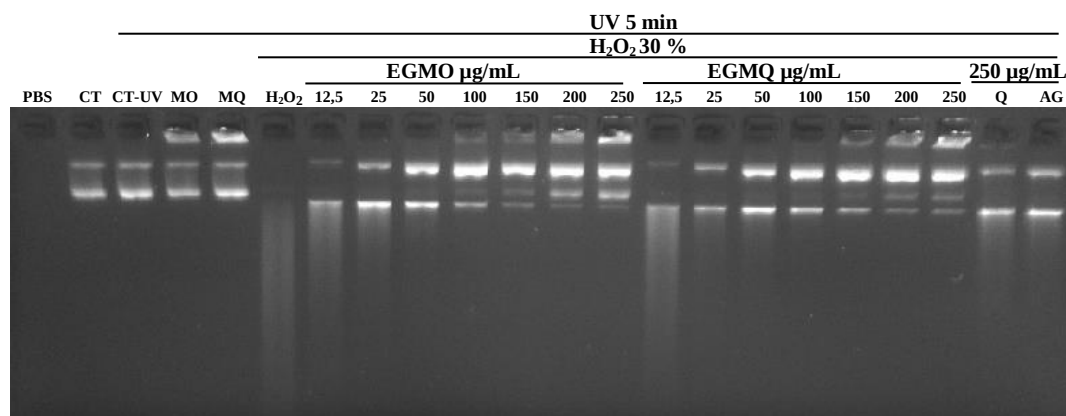
Figura 1. Proteção contra a oxidação de proteína induzida por AAPH (75 mM), promovida por EGMO (A) e EGMQ (B) em diferentes concentrações. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. *vs. AAPH; *** $p < 0.001$.

3.2. Ensaio de danos oxidativos induzidos em DNA

Os extratos foram avaliados frente a fragmentação induzida por radiação ultravioleta e H_2O_2 em DNA plasmidial. Como resultados, evidenciamos que ambos os extratos de geoprópolis apresentaram ação contra a fragmentação oxidativa, como mostrado na figura 2A-B. Nos controles positivos expostos a radiação UV e H_2O_2 , observou-se perda total da integridade do DNA. No entanto, na presença dos extratos a integridade do DNA foi protegida de forma concentração dependente, sendo mais efetivos que os controles positivos quercetina e ácido gálico. Nas concentrações iniciais de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ foram observados redução da

fragmentação do DNA de $18,9 \pm 0,5$; $32,6 \pm 2,1$ e $66,3 \pm 2,2\%$ para EGMO e $15,8 \pm 0,9$; $81,9 \pm 5,9$ e $83,8 \pm 2,4\%$ para EGMQ. Por outro lado, as maiores concentrações (100 – 250 $\mu\text{g/mL}$) de ambos os extratos, demonstraram 100% de proteção contra a fragmentação do DNA.

(A)



(B)

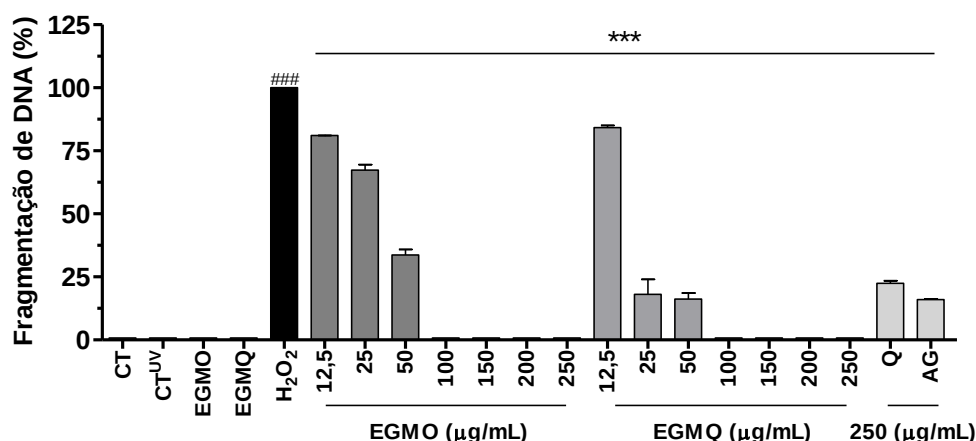


Figura 2. Proteção contra a fragmentação oxidativa em DNA plasmidial induzida por radiação UV e H₂O₂ (30%) promovida por EGMO/EGMQ em diferentes concentrações. (A) Imagem representativa do gel de agarose com os respectivos tratamentos. (B) Fragmentação de DNA (%). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. # vs. CT; *vs. UV/H₂O₂; ***, ### p < 0.001.

3.3. Ensaios *in vivo* utilizando o modelo *Caenorhabditis elegans*

3.3.1. Toxicidade

No modelo *in vivo* *C. elegans* o primeiro parâmetro avaliado foi a toxicidade. Neste ensaio, os nematoides foram tratados com EGMO e EGMQ e conforme a figura 3A-D, após 24 e 48 h não foram observados efeitos tóxicos em nenhuma das concentradas testadas (12.5 até 250 $\mu\text{g/mL}$), permitindo a realização dos próximos ensaios com segurança.

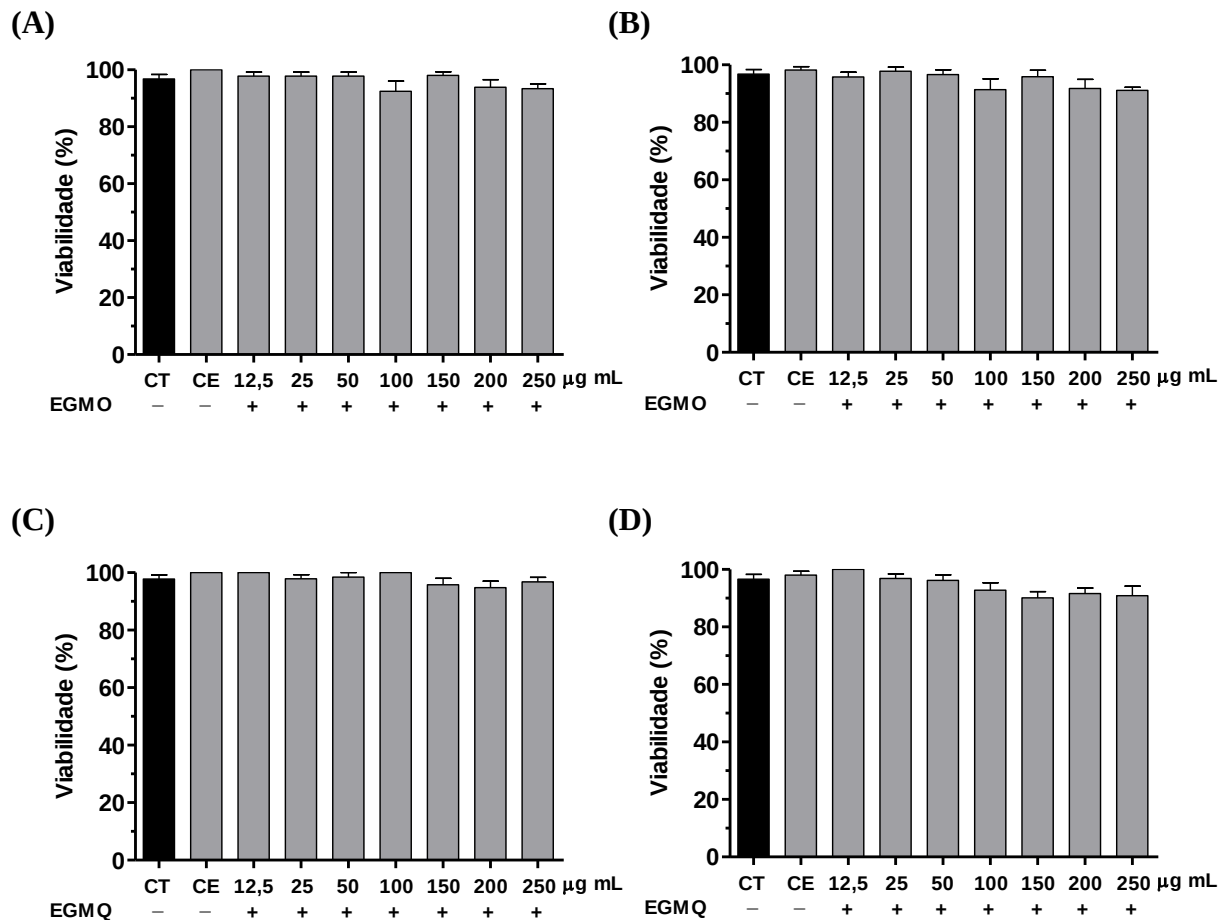
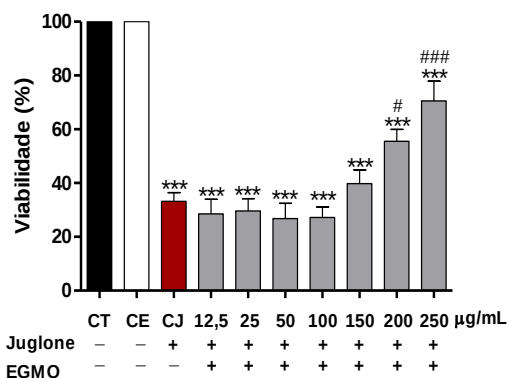


Figura 3. Toxicidade dos extratos de geoprópolis sobre *C. elegans* nos períodos de (A) 24 h e (B) 48 h para EGMO e (C) 24 h e (D) 48 h para EGMQ. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM.

3.3.2. Proteção contra ao estresse oxidativo induzido por Juglone

Após a constatação da ausência de toxicidade nas concentrações avaliadas de ambos os extratos, o efeito protetor do EGMO e do EGMQ foi avaliado através da sobrevivência dos *C. elegans* sob estresse oxidativo induzido por Juglone (80 μ M), após o período de 24 h. Como resultados, foi observado um aumento na sobrevivência de 22,3 e 37,3% dos nematoides tratados com as concentrações de 200 e 250 μ g/mL do EGMO e de 23,9% na concentração de 250 μ g/mL do EGMQ, como mostra a figura 4A-B.

(A)



(B)

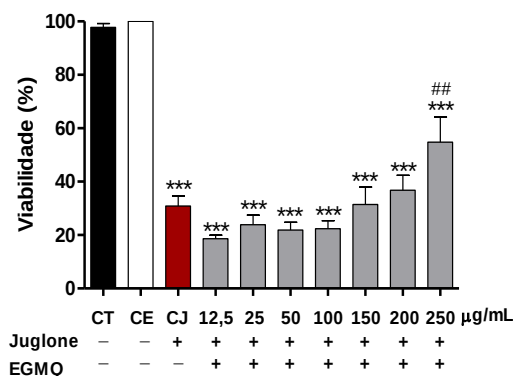
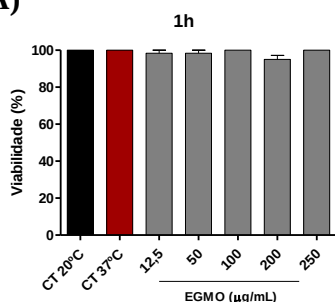


Figura 4. Efeito protetor do EGMO (A) e EGMQ (B) contra o estresse oxidativo induzido por Juglone após 24 h em *C. elegans*. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. * vs. CT; # vs. CJ; *,# $p < 0.05$; **,## $p < 0.01$; ***,### $p < 0.001$.

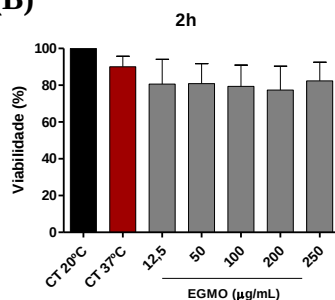
3.3.3. Proteção contra o estresse térmico

No ensaio de estresse térmico os resultados mostram que ambos os extratos de geoprópolis apresentaram ação protetora. Como observado na figura 5C, nas concentrações de 12,5 – 100 $\mu\text{g/mL}$, o EGMO reduziu a mortalidade dos nematoides no período de 3 h. Além disso, o extrato também demonstrou proteção no período de 4 h, nas concentrações de 100, 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$ (figura 5D). Na figura 6C, foi constatado que o EGMQ reduziu a mortalidade no período de 3 h em todas as concentrações avaliadas.

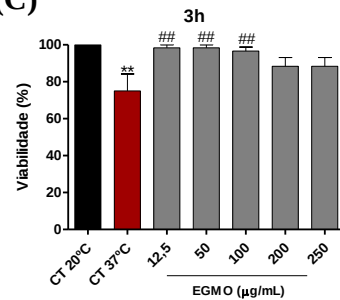
(A)



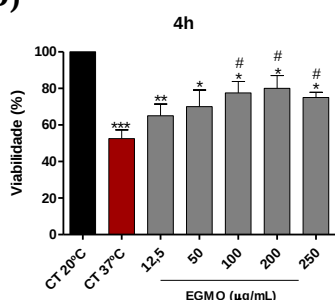
(B)



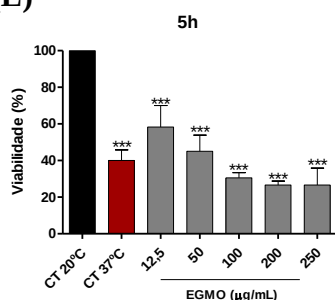
(C)



(D)



(E)



(F)

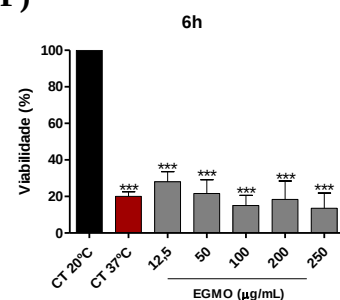


Figura 5. Efeitos do EGMO em *C. elegans* após os períodos de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E) e 6h (F) de indução de estresse térmico. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. * vs. CT20 °C; # vs. CT37 °C; *,# $p < 0.05$; **,## $p < 0.01$; ***,### $p < 0.001$.

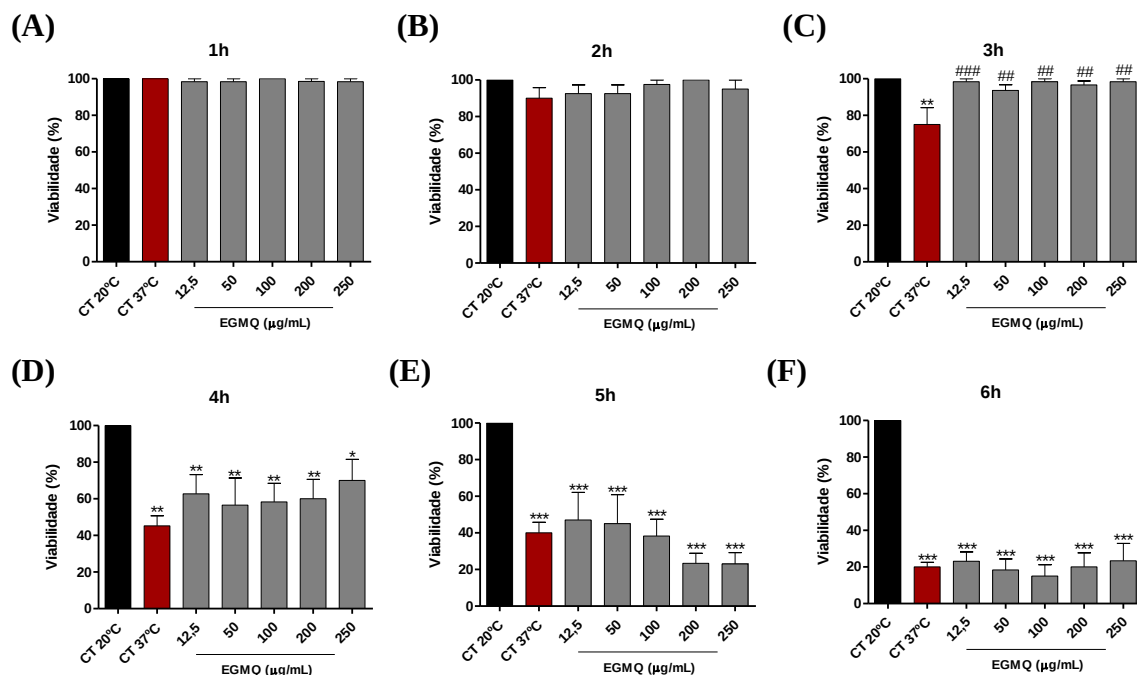
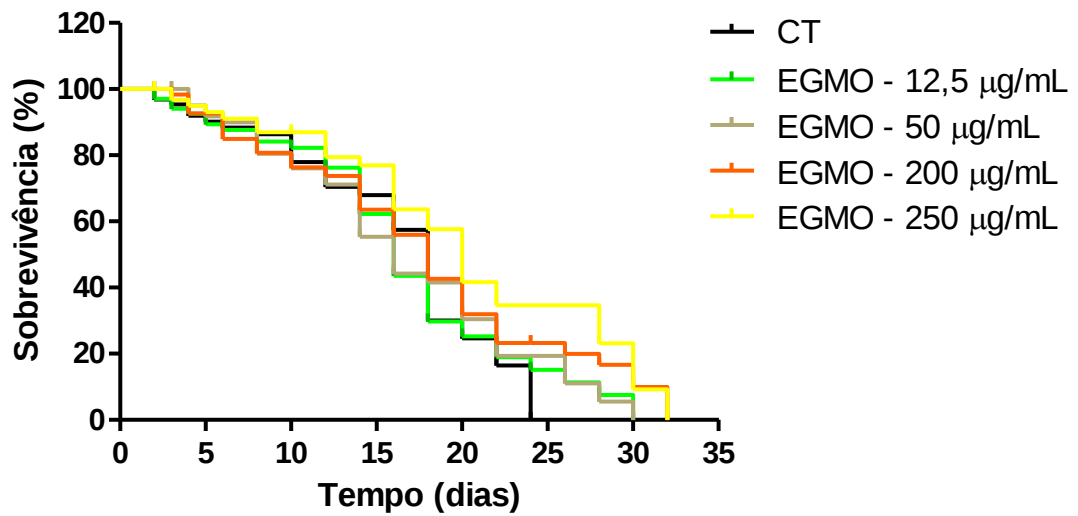


Figura 6. Efeitos do EGMQ em *C. elegans* após os períodos de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E) e 6h (F) de indução de estresse térmico. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. * vs. CT20 °C; # vs. CT37 °C; *, # $p < 0,05$; **, ## $p < 0,01$; ***, ### $p < 0,001$.

3.3.4. Ensaio de longevidade

Neste ensaio, nossos resultados mostram que os nematoides tratados com EGMO ou EGMQ apresentaram um aumento em sua expectativa de vida, como observado na figura 7A-B. Os nematoides do grupo controle apresentaram tempo de vida máximo de 24 dias. Por outro lado, os *C. elegans* tratados com EGMO nas concentrações de 12,5 e 50 µg/mL e 200 e 250 µg/mL, viveram por 30 e 32 dias, representando 25 e 33,3% de aumento na longevidade, respectivamente. Os *C. elegans* tratados com EGMQ apresentaram resultados similares aos observados no tratamento com EGMO. Adicionalmente, a maior concentração de ambos os extratos foi capaz de aumentar em cerca de 11% a expectativa média de vida dos *C. elegans*, quando comparados ao grupo controle, como mostra a tabela 1.

(A)



(B)

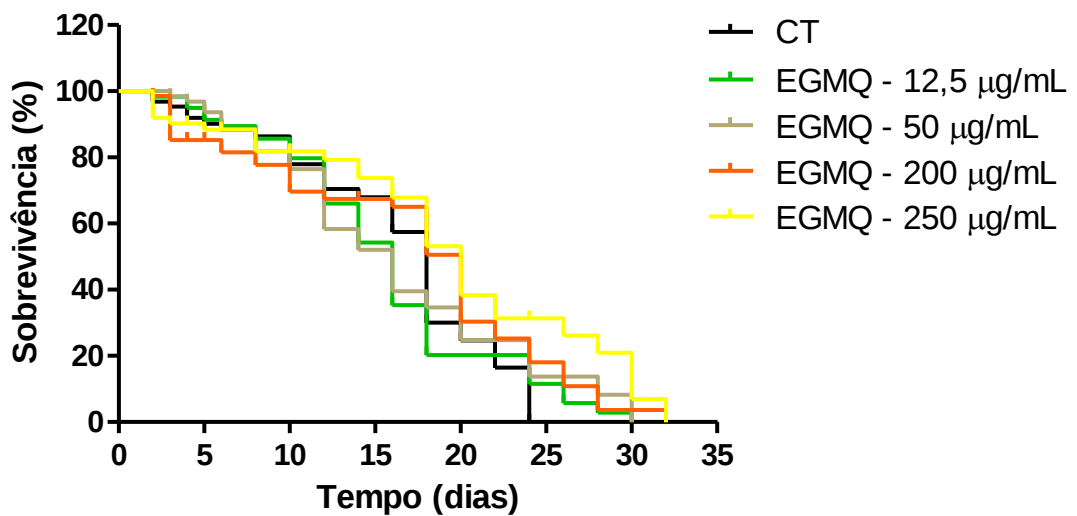


Figura 7. Efeitos dos extratos de geoprópolis sobre a expectativa de vida de *C. elegans*. (A) Nematoides tratados com diferentes concentrações do EGMO e (B) nematoides tratados com diferentes concentrações do EGMQ. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM.

Tabela 1. Efeitos dos extratos de geoprópolis na expectativa média de *C. elegans* selvagens em condições padrão.

Longevidade	Expectativa média de vida ^a	Valor P (log rank) vs. Controle ^b	N ^{oc}
Controle	18		120 (2)
EGMO 12,5 µg/mL	16	0,7563	120 (2)
EGMO 50 µg/mL	16	0,3390	120 (2)
EGMO 200 µg/mL	18	0,1725	120 (2)
EGMO 250 µg/mL	20	0,0068**	120 (2)
EGMQ 12,5 µg/mL	16	0,8620	120 (2)
EGMQ 50 µg/mL	16	0,7451	120 (2)
EGMQ 200 µg/mL	20	0,2352	120 (2)
EGMQ 250 µg/mL	20	0,0285*	120 (2)

Representa resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$ e ** $p < 0,01$), quando o grupo tratado foi comparado com o grupo controle.

^a Expectativa média de vida mensurada em dias.

^b As comparações foram realizadas usando o teste log-rank (Mantel-Cox).

^c Número total de animais analisados, o número entre parentes representa a quantidade de ensaios independentes.

4. Discussão

Os produtos naturais possuem uma diversidade estrutural única de componentes químicos, dos quais podem conferir diferentes atividades biológicas (Sorokina & Steinbeck, 2020). Dentre estes, a geoprópolis é um produto de origem apícola, sendo produzida e utilizada pelas abelhas sem ferrão em seus ninhos como material de construção (Nogueira-Neto, 1997). Existem relatos sobre a utilização deste produto na medicina popular, no tratamento de infecções oculares, respiratórias e cutâneas (Souza *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2016). Apesar do seu uso para fins medicinais, ainda são escassos os estudos sobre a geoprópolis, principalmente sobre as suas propriedades farmacológicas.

Em pesquisas anteriores, evidenciamos as propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antimutagênica e antioxidante da geoprópolis produzidas pelas espécies de abelhas sem ferrão *Melipona orbignyi* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b). Agora, dando continuidade em nossos estudos, a capacidade protetora dos extratos de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) e *M.q.anthidioides* (EGMQ) foi avaliada frente a danos oxidativos induzidos em macromoléculas e no modelo *in vivo* *C. elegans*.

Neste estudo, o EGMO e o EGMQ promoveram a proteção de proteínas contra danos oxidativos induzidos pelo AAPH. Este efeito está relacionado a presença de substâncias bioativas já identificadas nos extratos, uma vez que já constatamos que um dos mecanismos antioxidantes do EGMO/EGMQ é a doação de elétrons para a estabilização de radicais livres, sejam estes hidrofílicos ou lipofílicos (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b).

As proteínas são macromoléculas fundamentais para a biologia celular e muito sensíveis a danos oxidativos, que podem alterar sua estrutura e ocasionar perda de função (Tramutola *et al.*, 2017). Danos oxidativos em proteínas alteram a atividade de enzimas e receptores, de mecanismos de transdução de sinais e da susceptibilidade a proteólise (Lobo *et al.*, 2010). As ERO promovem danos em diferentes aminoácidos e desencadeiam alterações estruturais oxidativas em proteínas, como a fragmentação e/ou formação de agregados (Mayo *et al.*, 2003; Cecarini *et al.*, 2007). Tais eventos estão associados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Lévy *et al.*, 2019).

Em adição ao efeito de proteção em proteínas, o EGMO e o EGMQ também foram capazes de proteger o DNA contra os danos oxidativos causados por radicais hidroxila, gerados através da fotólise do H_2O_2 induzida por luz UV (Rajan *et al.*, 2013). O DNA é uma macromolécula extremamente sensível a danos oxidativos. Radicais hidroxila reagem com as bases do DNA, abstraindo elétrons ou átomos de hidrogênio, promovendo a clivagem e quebra da fita de DNA (Collin, 2019; Wu *et al.*, 2020). Danos oxidativos no DNA podem se acumular em sua estrutura e dar início a instabilidade genômica, ou seja, um aumento da tendência de o material genético sofrer mutações, cenário este relacionado ao declínio da função celular, envelhecimento e ao processo carcinogênico (Savina *et al.*, 2016; Schumacher *et al.*, 2021). Os extratos ainda tiveram ação protetora mais eficiente em comparação aos controles padrão ácido gálico e quercetina. Este efeito pode ser decorrente do sinergismo entre as moléculas bioativas presentes nos extratos.

É possível encontrar uma presença diversificada de componentes químicos em geoprópolis de diferentes abelhas sem ferrão, tais como ácidos fenólicos (gálico, caféico, siríngico, benzóico) (Zhao *et al.*, 2017), flavonoides (ácido vanílico, rutina, aromadendrina, quercetina, narigerina) (Ferreira *et al.*, 2019) taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) (Dutra *et al.*, 2019), alcaloides (Coelho *et al.*, 2015) e terpenos (Santos *et al.*, 2017b).

A literatura reporta que compostos fenólicos como os flavonoides, exibem atividade antioxidante por diferentes mecanismos, tais como: (I) doando elétrons e átomos de hidrogênio para estabilização de radicais livres, (II) quelando íons metálicos catalisadores de ERO e (III)

regulando oxidases e enzimas antioxidantes (Yan *et al.*, 2020). Além disto, estudos reportam a capacidade de algumas destas moléculas de se ligar ao DNA e impedir danos oxidativos (Sjakste *et al.*, 2020). Nesta perspectiva, a presença dos flavonoides naringerina, aromandedrina e metil aromadendrina evidenciados na geoprópolis de *M. orbignyi* e *M. q. anthidioides* (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b), podem ser responsáveis pelos efeitos de proteção observados em proteínas e DNA.

Após a constatação do efeito protetor promovido pelos extratos sobre macromoléculas, seguimos para avaliação utilizando o modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*, um nematóide de fácil criação e bem caracterizado geneticamente (Kim *et al.*, 2016). Este pequeno organismo apresenta boa correlação e predições consistentes em relação a toxicidade em mamíferos (Hunt *et al.*, 2017) e vários genes homólogos aos genes em humanos (Ayuda-Durán *et al.*, 2020). O os extratos de geoprópolis não promoveram toxicidade em nenhuma das concentrações testadas em *C. elegans*. Resultados negativos para toxicidade também foram observados no extrato da própolis (2 – 8 mg/mL) da espécie *Heterotrigona itama* em *C. elegans* (Abdullah *et al.*, 2019), e para uma cumarina isolada da geoprópolis de *Melipona scutellaris*, Cinamoiloxi-mammeisina (2 – 20 mg/kg) em *Galleria mellonella* (Cunha *et al.*, 2020).

Em relação a proteção contra o estresse oxidativo, os extratos foram capazes de aumentar a sobrevivência dos *C. elegans* expostos ao Juglone, substância que promove a geração de ERO intracelulares H_2O_2 e $O_2^{\bullet}$ (Wang *et al.*, 2019). Derivados de ácidos fenólicos e flavonoides presentes no EGMO/EGMQ podem ser responsáveis pela proteção contra os danos oxidativos induzidos pelo juglone, e podem estar atuando de maneira direta sobre as ERO geradas e/ou de maneira indireta, regulando o sistema de defesa antioxidante endógeno dos *C. elegans*. A literatura reporta que compostos fenólicos podem proteger as células de danos oxidativos regulando vias de sinalização relacionadas a ação antioxidante (Yan *et al.*, 2020). Neste sentido, a modulação de vias antioxidantes em *C. elegans* é uma possibilidade de atuação dos extratos de geoprópolis.

Uma importante via relacionada a resposta ao estresse oxidativo (homóloga em mamíferos), é a via da insulina/IGF-1 (Back *et al.*, 2012), iniciada pelo receptor daf-2 (IGFR em humanos), que regula negativamente os fatores transcricionais *daf-16* e *Skn-1*, responsáveis pela expressão de genes associados a longevidade e enzimas antioxidantes (Mathew *et al.*, 2017; Ayuda-Durán *et al.*, 2020). *Daf-16* e *Skn-1* são ortólogos funcionais aos fatores transcricionais *FoxO* e *Nrf* em mamíferos (Tullet *et al.*, 2017). Na literatura é reportado que

compostos fenólicos presentes em própolis e outros produtos naturais são capazes de modular positivamente *daf-16* e *Snk-1* (Martel *et al.*, 2020).

Os *C. elegans* também foram submetidos ao estresse térmico, condição que pode induzir ao estresse oxidativo através do aumento da temperatura (Emami *et al.*, 2021). Durante este tipo de estresse, as células do *C. elegans* ativam o mecanismo de resposta ao choque térmico, regulado pelo fator de transcrição *HSF-1* (*Heat Shock factor-1*), que por sua vez regula os níveis de expressão de proteínas de defesa específicas, conhecidas como chaperonas ou *Heat Shock proteins* (*HSP's*)/proteínas de choque térmico (Brunquell *et al.*, 2016; Kyriakou *et al.*, 2022). Os animais tratados apresentaram um aumento na sobrevivência, o que indica um aumento em sua capacidade de termotolerância. A proteção somente em 3 h ou em 3 e 4 h sugere que após um determinado período de estresse térmico, os extratos não consigam melhorar a recuperação dos animais devido a gravidade dos danos gerados durante as últimas horas de estresse. No estudo de Jovic *et al.* (2017), após 4 h de estresse térmico, foram observados danos irreversíveis na sobrevivência, contagem de progênie e movimentação dos nematoides.

Durante o estresse térmico, as proteínas podem ter seu dobramento incorreto e sua conformação alterada, podendo promover a formação de agregados proteicos (Kim *et al.*, 2016; Kyriakou *et al.*, 2022). Seguindo este raciocínio, compostos naturais que aumentem a eficiência do mecanismo de resposta ao choque térmico, são potenciais candidatos a medicamentos para a prevenção de doenças neurodegenerativas promovidas por danos em proteínas.

Dentre as vias das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), a via de sinalização *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) é responsável por coordenar respostas celulares frente a fatores de estresse, incluindo citocinas inflamatórias, radiação UV, estresse oxidativo e o estresse ao calor (Oh *et al.*, 2005). Ao detectar estímulos estressores, a proteína JNK-1 é capaz de ativar *daf-16* e promover sua translocação ao núcleo, onde irá induzir a expressão de genes-alvo responsáveis por evitar estresses prejudiciais (Oh *et al.*, 2005; Mathew *et al.*, 2017). O estresse térmico é capaz de impulsionar a translocação de *daf-16* para o núcleo (Tepper *et al.*, 2013), e em consequência, a resposta ao choque térmico é induzida para promover adaptação e a sobrevivência dos nematoides (Kyriakou *et al.*, 2022).

A literatura reporta que a resistência e o aumento da sobrevivência sob alguns tipos de estresse abiótico como radiação UV, estresse oxidativo e estresse térmico estão relacionados a longevidade (Back *et al.*, 2012, Feng *et al.*, 2015). Seguindo esta perspectiva, os animais foram tratados diariamente com EGMO e EGMQ até o momento em que todos estivessem mortos. Interessantemente, ambos os extratos foram capazes de aumentar a expectativa de vida dos

nematóides, em todas as concentrações testadas. O efeito sobre a expectativa de vida pode estar associado as propriedades antioxidantes dos extratos de geoprópolis. Em adição, este efeito pode estar associado a modulação da expressão dos fatores de transcrição *daf-16* e *Skn-1*.

Nenhuma informação sobre os efeitos de extratos de geoprópolis sobre o modelo *C. elegans* foi encontrada na literatura. Entretanto, a naringerina (presente em nossos extratos), foi investigada por Ge *et al.* (2021), constatando-se a promoção da longevidade em *C. elegans* sob condições normais e de estresse oxidativo. Neste estudo, a naringerina melhorou a locomoção, atrasou a paralisia, reverteu a quimiotaxia defeituosa induzida pela proteína beta-amilóide, aumentou a atividade de enzimas antioxidantes e reduziu o conteúdo de ERO e MDA. Além disto, modulou positivamente os fatores transcricionais *daf-16* e *skn-1* e modulou negativamente *daf-2*, indicando a promoção da longevidade através da via insulina/IGF-1 e das MAPKs.

As vias de sinalização do receptor de insulina/IGF-1 e JNK (MAPK) são importantes cascatas de sinalização envolvidas em respostas celulares ao estresse (Wolf *et al.*, 2008). A sinalização positiva da via *daf-2* inibe a atividade de *daf-16* e *Skn-1*, enquanto a sinalização positiva da via JNK leva a ativação de *daf-16*. Uma vez ativa, a *daf-16* induz a expressão de genes de enzimas antioxidantes e de proteínas de choque térmico, promovendo um aumento da resistência ao estresse e de longevidade (Kim *et al.*, 2016; Mathew *et al.*, 2017; Ayuda-Durán *et al.*, 2020).

5. Conclusões

Em conjunto, estes dados ampliam as perspectivas sobre o potencial antioxidante e efeitos benéficos dos extratos de geoprópolis de *M. orbigny* e *M. q.anthidioides*, evidenciados através de suas atividades protetoras frente a danos oxidativos induzidos a proteínas e DNA, proteção contra o estresse oxidativo e térmico, e aumento da expectativa de vida em *C. elegans*. Embora, pouco conhecida na literatura científica, a geoprópolis é um produto das abelhas nativas sem ferrão utilizada na medicina tradicional, que demonstra potencial para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos voltados para prevenção e/ou tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelos órgãos de fomento Fundação de Apoio para o Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia da Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Abdullah, N. A., Ja'afar, F., Yasin, H. M., Taha, H., Petalcorin, M. I., Mamit, M. H., Usman, A. Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. *Heliyon*, v. 5, n. 9, 2019.
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, M. A., Santos-Buelga, C. *Caenorhabditis elegans* as a model organism to evaluate the antioxidant effects of phytochemicals. *Molecules*, v. 25, n. 14, p. 3194, 2020.
- Back, P., Braeckman, B. P., Matthijssens, F. “ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling?”. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2012, 2012.
- Brunquell, J., Morris, S., Lu, Y., Cheng, F., Westerheide, S. D. The genome-wide role of HSF-1 in the regulation of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *BMC genomics*, v. 17, n.1, p.1-18, 2016.
- Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M., Keller, J. N. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 2, p. 93-104, 2007.
- Chiang, J. C., Chen, W. M., Newman, C., Chen, B. P., Lee, H. Lysophosphatidic Acid Receptor 3 Promotes Mitochondrial Homeostasis against Oxidative Stress: Potential Therapeutic Approaches for Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Antioxidants*, v. 11, n. 2, p. 351, 2022.
- Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R. O., Araújo, M. J. A. M., Búfalo, M. C., Sforcin, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013.
- Coelho, G. R., Mendonça, R. Z., Vilar, K. D. S., Figueiredo, C. A., Badari, J. C., Taniwaki, N., Negri, G. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against *antihherpes simplex virus* (HSV-1). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, 2015.
- Collin, F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n.10, p. 2407, 2019.
- Cunha, M. G., Sardi, J. D. C. O., Freires, I. A., Franchin, M., Rosalen, P. L. Antimicrobial, anti-adherence and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of a 4-phenyl coumarin derivative isolated from Brazilian geopropolis. *Microbial pathogenesis*, v. 139, p. 103855, 2020.
- Dutra, R. P., Bezerra, J. L., Silva, M. C. P. D., Batista, M. C. A., Patrício, F. J. B., Nascimento, F. R. F., Guerra, R. N. M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.29, p. 287-293, 2019.
- Emami, N. K., Jung, U., Voy, B., Dridi, S. Radical response: effects of heat stress-induced oxidative stress on lipid metabolism in the avian liver. *Antioxidants*, v. 10, n. 1, p. 35, 2020.
- Embrapa, 2023. Cerrado. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/contando-ciencia/bioma-cerrado>> Acesso em: 17 de agosto de 2023
- Fatma, H., Jameel, M., Siddique, H. R. An Update on Phytochemicals in Redox Homeostasis:“Virtuous or Evil” in Cancer Chemoprevention?. *Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 201-222, 2023.

- Feng, S., Cheng, H., Xu, Z., Shen, S., Yuan, M., Liu, J., Ding, C. Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p.188-194, 2015.
- Ferreira, B. L., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Micke, G. A., Maltez, H. F., Ressureição, C., Fett, R. Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. *Food Research International*, v. 126, p. 108683, 2019.
- Forman, H. J., Zhang, H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 20, n. 9, p. 689-709, 2021.
- Franchin, M., Rosalen, P. L., da Cunha, M. G., Silva, R. L., Colón, D. F., Bassi, G. S., Cunha, T. M. Cinnamoyloxy-mammeisin isolated from geopropolis attenuates inflammatory process by inhibiting cytokine production: involvement of MAPK, AP-1, and NF- κ B. *Journal of natural products*, v. 79, n. 7, p.1828-1833, 2016.
- Ge, Y., Chen, H., Wang, J., Liu, G., Cui, S. W., Kang, J., Wang, H. Naringenin prolongs lifespan and delays aging mediated by IIS and MAPK in *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, v. 12, n. 23, p. 12127-12141, 2021.
- Goh, J., Wong, E., Soh, J., Maier, A. B., Kennedy, B. K. Targeting the molecular & cellular pillars of human aging with exercise. *The FEBS Journal*, v. 290, n. 3, p. 649-668, 2023.
- Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Reshi, M. S. Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives. *Cells*, v. 11, n.3, p. 552, 2022.
- Hunt, P. R. "The *C. elegans* model in toxicity testing". *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2017.
- Jovic, K., Sterken, M. G., Grilli, J., Bevers, R. P., Rodriguez, M., Riksen, J. Snoek, L. B. Temporal dynamics of gene expression in heat-stressed *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, v. 12, n. 12, p. e0189445, 2017.
- Kim, D. K., Kim, T. H., Lee, S. J. Mechanisms of aging-related proteinopathies in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 48, n. 10, p. e263-e263, 2016.
- Kumar, A., Chattopadhyay, S. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry*, v. 100, n. 4, p. 1377-1384, 2007.
- Kyriakou, E., Taouktsi, E., Syntichaki, P. The Thermal Stress Coping Network of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 23, 14907, 2022.
- Lévy, E., El Banna, N., Baille, D., Heneman-Masurel, A., Truchet, S., Rezaei, H., Vernis, L. Causative links between protein aggregation and oxidative stress: a review. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 16, p. 3896, 2019.
- Li, J., Wang, Z., Li, C., Song, Y., Wang, Y., Bo, H., Zhang, Y. Impact of exercise and aging on mitochondrial homeostasis in skeletal muscle: Roles of ROS and epigenetics. *Cells*, v.11, n. 13, p. 2086, 2022.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, v. 4, n.8, p. 118, 2010.
- Long, N. A., Golla, U., Sharma, A., Claxton, D. F. Acute myeloid leukemia stem cells: Origin, characteristics, and clinical implications. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 18, n. 4, p. 1211-1226, 2022.

- Martel, J., Wu, C. Y., Peng, H. H., Ko, Y. F., Yang, H. C., Young, J. D., Ojcius, D. M. "Plant and fungal products that extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*". *Microbial Cell*, v. 7, n. 10, p. 255, 2020.
- Mathew, R., Bhadra, M. P., Bhadra, U. "Insulin/insulin-like growth factor-1 signalling (IIS) based regulation of lifespan across species". *Biogerontology*, v. 18, n. 1, p. 35-53, 2017.
- Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Lopez-Burillo, S., Reiter, R. J. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free radical research*, v. 37, n.5, p.543-553, 2003.
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., Van Breusegem, F. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, n. 10, p. 663-679, 2022.
- Nogueira-Neto, P. "Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão". 1. Ed. São Paulo: Edição Nogueirapis, p. 446, 1997.
- Oh, S. W., Mukhopadhyay, A., Svrzikapa, N., Jiang, F., Davis, R. J., Tissenbaum, H. A. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n.12, p. 4494-4499, 2005.
- Oliveira, L. P. G., Conte, F. L., Cardoso, E. D. O., Conti, B. J., Santiago, K. B., Golim, M. D. A., Cruz, M. T., Sforcin, J. M. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 68, n. 12, p. 1551-1558, 2016.
- Oliveira, L. P. G., Conte, F. L., de Oliveira Cardoso, E., Conti, B. J., Santiago, K. B., de Assis Golim, M., Sforcin, J. M. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. *Life sciences*, v. 217, p. 81-90, 2019.
- Organização Mundial da Saúde. Noncommunicable diseases. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>> acessado em: setembro de 2023.
- Rajan, I., Narayanan, N., Rabindran, R., Jayasree, P. R., Manish Kumar, P. R. Zingerone protects against stannous chloride-induced and hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in vitro. *Biological trace element research*, v. 155, p. 455-459, 2013.
- Remigante, A., Morabito, R. Cellular and molecular mechanisms in oxidative stress-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 14, p. 8017, 2022.
- Santos, C. M., Campos, J. F., Dos Santos, H. F., Balestieri, J. B. P., Silva, D. B., de Picoli Souza, K., Dos Santos, E. L. Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2017, 2017a.
- Santos, H. F. D., Campos, J. F., Santos, C. M. D., Balestieri, J. B. P., Silva, D. B., Carollo, C. A., Dos Santos, E. L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 5, p. 953, 2017b.
- Savina, N. V., Nikitchenko, N. V., Kuzhir, T. D., Rolevich, A. I., Krasny, S. A., Goncharova, R. I. The cellular response to oxidatively induced DNA damage and polymorphism of some DNA repair genes associated with clinicopathological features of bladder cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.

- Schumacher, B., Pothof, J., Vijg, J., & Hoeijmakers, J. H. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature*, v. 592, n. 7856, p. 695-703, 2021.
- Sies, H., Jones, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, v. 24, n. 8, p. 1583, 2019.
- Sjakste, N., Djelić, N., Dzintare, M., Živković, L. DNA-BINDING and DNA-protecting activities of small natural organic molecules and food extracts. *Chemico-Biological Interactions*, v. 323, p. 109030, 2020.
- Sobeh, M., Mahmoud, M. F., Abdelfattah, M. A., Cheng, H., El-Shazly, A.M., Wink. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo". *Journal of ethnopharmacology*, v. 213, p. 38-47, 2018.
- Sorokina, M., & Steinbeck, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of cheminformatics*, v. 12, n. 1, p. 20, 2020.
- Sousa-Fontoura, D. M., Olinda, R. G., Viana, G. A., De Fm Costa, K. M., Batista, J. S., Serrano, R. M., Silva, O. M. O. D., Camara, C. A., Silva, T. M. Wound healing activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona subnitida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 30, p. 367-373, 2020.
- Souza, R. C. D. S., Yuyama, L. K. O., Aguiar, J. P. L., & Oliveira, F. P. M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazonica*, v. 34, p. 333-336, 2004.
- Tepper, R. G., Ashraf, J., Kaletsky, R., Kleemann, G., Murphy, C. T., Bussemaker, H. J. PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell*, v. 154, n. 3, p. 676-690, 2013.
- Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., Butterfield, D. A. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain research bulletin*, v. 133, p. 88-96, 2017.
- Tullet, J. M., Green, J. W., Au, C., Benedetto, A., Thompson, M. A., Clark, E., Gems, D. The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging cell*, v. 16, n.5, p. 1191-1194, 2017.
- Wang, P., Zhang, S. D., Jiao, J., Wang, W., Yu, L., Zhao, X. L., Fu, Y. J. ROS-mediated p53 activation by juglone enhances apoptosis and autophagy in vivo and in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 379, p.114647, 2019.
- Wolf, M., Nunes, F., Henkel, A., Heinick, A., Paul, R. J. The MAP kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: Location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness. *Journal of cellular physiology*, v. 214, n. 3, p. 721-729, 2008.
- Wu, X., Dhanasekaran, S. Protective effect of leaf extract of *Abutilon indicum* on DNA damage and peripheral blood lymphocytes in combating the oxidative stress. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 28, n. 8, p. 943-950, 2020.
- Yan, Z., Zhong, Y., Duan, Y., Chen, Q., Li, F. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Animal Nutrition*, v. 6, n.2, p. 115-123, 2020.

Zhao, L., Yu, M., Sun, M., Xue, X., Wang, T., Cao, W., Sun, L. Rapid determination of major compounds in the ethanol extract of geopropolis from Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. *Molecules*, v. 22, n. 11, p. 1935, 2017.

Artigo 2

Geoprópolis de abelhas sem ferrão inibem a migração celular e induzem a morte de células cancerosas via apoptose e necroptose

Helder Freitas dos Santos¹, David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro¹, Jaqueline Ferreira Campos¹, José Benedito Perrela Balestieri¹, Kely de Picoli Souza¹, Edson Lucas dos Santos¹

¹Grupo de Estudos em Bioprospecção e Biotecnologia Aplicados ao Metabolismo (GEBBAM), Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados Itahum, Km 12, CEP: 79.804-970, Dourados, MS, Brasil.

Resumo

A geoprópolis é um produto apícola utilizado na medicina popular no tratamento de diferentes enfermidades, no entanto, é pouco investigada frente ao seu potencial anticâncer. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos anticâncer dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *Melipona orbignyi* (EGMO) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ). Para isto, o efeito sobre a viabilidade de células não cancerígenas e de linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço, pulmão, melanoma e leucemia foi investigado através do ensaio de viabilidade celular com o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltriazólio). Posteriormente, a migração celular das linhagens de melanoma foi investigada pelo ensaio de ranhura. Os mecanismos envolvidos na morte celular promovida pelos extratos de geoprópolis foram determinados por meio de ensaios de citometria de fluxo. Para confirmação destes mecanismos, foram utilizados os inibidores farmacológicos Z-VAD, Z-DEVD e NEC-1. Como resultados, ambos os extratos de geoprópolis reduziram a viabilidade de todas as linhagens cancerígenas, de maneira seletiva em comparação às células não cancerígenas. O EGMO e EGMQ reduziram a migração celular de todas as linhagens celulares de melanoma avaliadas. Em relação a citotoxicidade, o principal mecanismo de morte celular desencadeado pelos extratos de geoprópolis em células B16F10-Nex2 e Jurkat foi apoptose tardia, seguida de necrose. Nas células K562 a morte celular foi induzida via apoptose inicial. Em adição, o uso de inibidores confirmou a morte por apoptose dependente da ativação de caspases nas células de melanoma murino e leucemia, e de necroptose via ativação de RIPK-1 em B16F10-Nex2 e Jurkat. Em conjunto, nossos dados mostram o potencial anticâncer do geoprópolis de *M. orbignyi* e *M. q. anthidioides* frente a diferentes linhagens de células de melanoma e leucemia.

Palavras-chave: Produto apícola, Potencial terapêutico, Citotoxicidade seletiva, Melanoma, Leucemia

1. Introdução

Um dos principais problemas de saúde pública no mundo é o câncer, sendo reconhecido pela Organização Mundial da Saúde., (2024) como a segunda causa de mortes a nível global. Em 2020, 19 milhões de casos e quase 10 milhões de óbitos foram relatados (Sung *et al.*, 2021). De acordo com a GLOBOCAN (Global Cancer Observatory, 2024), as projeções para 2040 serão de 29,9 milhões de novos casos e cerca de 15,3 milhões de óbitos.

O Câncer é uma doença genética, que resulta de mutações que alteram o DNA e o padrão da expressão de genes que controlam a multiplicação e morte celular, transformando uma célula normal em uma célula cancerosa, cujas características incluem a proliferação descontrolada e a resistência aos mecanismos de morte por apoptose (National Cancer Institute, 2024). Uma célula cancerosa pode dar origem a um tumor, além de invadir e colonizar outras regiões do corpo para formar tumores secundários, em um processo conhecido como metástase (Pérez-González *et al.*, 2023).

Dentre os tipos de câncer, o câncer de pele está entre os mais prevalentes do mundo e com base na origem celular, pode ser classificado em não-melanoma ou melanoma (Balaha *et al.*, 2023). O câncer de pele não-melanoma tem origem nos queratinócitos, é a forma mais incidente da doença (Chandra *et al.*, 2023) e apresenta as menores taxas de mortalidade (Sung *et al.*, 2021). Por outro lado, o melanoma tem origem nos melanócitos, é um tumor maligno altamente metastático e se apresenta como a forma mais letal de câncer de pele (Chandra *et al.*, 2023). Em 2022, 78,8% dos casos de câncer de pele foram não-melanomas, onde a taxa de morte foi de 5,6%. Os outros 21,2% foram casos de melanoma, cuja taxa de morte foi de 17,6%, cerca de 3,1 vezes maior (GLOBOCAN, 2022ab).

Outro tipo de câncer que apresenta elevadas taxas de mortalidade são as leucemias, um câncer hematológico que afeta as células do tecido hematopoiético. As leucemias são caracterizadas pela proliferação anormal dos glóbulos brancos, causada por alterações genéticas em células tronco/progenitoras em diferentes estágios de diferenciação e maturação na medula óssea (Long *et al.*, 2022). Dependendo da origem celular, são classificadas em linfocítica ou mieloide, e de acordo com a progressão são classificadas em aguda ou crônica (Hao *et al.*, 2019; Ratley *et al.*, 2020).

As opções convencionais de tratamento para o melanoma incluem excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, e são utilizadas de acordo com o estágio da doença, localização do tumor e condições do paciente (Cassano *et al.*, 2021). Em relação a leucemia, os tratamentos mais comuns são quimioterapia, transplante de medula óssea e radioterapia (Maher *et al.*, 2021).

Drogas quimioterápicas são elementos farmacológicos extremamente essenciais nas terapias anticancerígenas (Zajackowska et al., 2019; Juszczak et al., 2022). No entanto, a baixa seletividade da maioria quimioterápicos promove toxicidade sistêmica e uma série de efeitos adversos (Kuryk et al., 2020; Boogaard et al., 2022). Em alguns casos, a manifestação de quimiorresistência (Guo et al., 2023) pode limitar ainda mais a eficácia do tratamento. Adicionalmente, terapias mais modernas, como a terapia alvo e imunoterapia, podem ser utilizadas, e apesar de efeitos adversos reduzidos (Kroschinsky et al., 2017), seu custo é elevado (Zeng et al., 2023).

A demanda crescente por novas abordagens terapêuticas contra o câncer, impulsiona a busca por moléculas mais eficientes e que possam sobrepor os efeitos adversos dos atuais tratamentos. Diferentes fármacos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, uma fonte inestimável de moléculas com propriedades farmacológicas. Dentre estes, a geoprópolis é um produto apícola produzido por algumas espécies de abelhas sem ferrão (Nogueira-neto, 1997), utilizando resinas vegetais, cera, pólen, secreções mandibulares e terra (Dutra et al., 2019; Oliveira et al., 2019). Este produto natural é utilizado pelas abelhas em seus ninhos, como proteção mecânica e para vedar fissuras e selar orifícios (Ferreira et al., 2020).

Alguns estudos reportam atividades biológicas deste produto natural, como as ações antimicrobiana, antimutagênica, anti-inflamatória, antioxidante (Santos et al., 2017a; Santos et al., 2017b; Coutinho et al., 2023), antiviral (Silva et al., 2023), cicatrizante (Sousa-Fontoura et al., 2020) e imunomodulatória (Oliveira et al., 2019), demonstrando que a geoprópolis é uma fonte natural importante de moléculas com potencial terapêutico. Apesar de diferentes relatos sobre suas propriedades terapêuticas, os dados na literatura continuam muito escassos, principalmente sobre os efeitos anticâncer. Alguns estudos têm investigado a ação antiproliferativa do extrato e dos constituintes químicos da geoprópolis de *Melipona scutellaris* (Cunha et al., 2013; 2016), e os efeitos anticâncer do extrato da geoprópolis de *M. fasciculata* (Cinegaglia et al., 2013), explorando os mecanismos de morte em células cancerígenas (Barboza et al., 2020) e a combinação com quimioterápicos (Bartolomeu et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos anticâncer dos extratos de geoprópolis das espécies de abelhas *Melipona orbignyi* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, contra diferentes linhagens cancerígenas, bem como investigar os mecanismos de ação envolvidos.

2. Material e métodos

2.1. Químicos e reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico e foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich/Merck. Os meios de cultivo celular DMEM alta glicose (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute*), soro fetal bovino (SFB) e mistura de antibióticos penicilina-streptomicina-neomicina foram adquiridos da empresa Gibco/Invitrogen (Minneapolis, USA). Os marcadores fluorescentes anexina V-FITC, 7-aminoactinomicina e iodeto de propídeo, utilizados para análises de citometria de fluxo, foram adquiridos da empresa BD Biosciences (California, USA).

2.2. Obtenção de amostras e preparação dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis

Amostras de geoprópolis produzidas pelas abelhas sem ferrão *M. orbignyi* e *M. q. anthidioides* (Cadastro SISGEN N°AF5168A) foram identificadas e obtidas pelo biólogo Prof. Dr. José Benedito Perrela Balestieri, em um meliponário no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (22°13'12''S e 54°49'2''O). Para preparação dos extratos, as amostras de geoprópolis foram maceradas com almofariz e pistilo e homogeneizadas com etanol 70%, na proporção de 1:3 (p/v). Em seguida, as soluções foram mantidas em uma incubadora shaker sob agitação moderada, sem presença de luz, durante 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram filtradas em papel filtro qualitativo 80 g/m² (ProLab, São Paulo, Brasil), concentradas em evaporador rotativo a vácuo (Gehaka, São Paulo, Brasil) e liofilizadas, obtendo-se assim os extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) e de *M. q. anthidioides* (EGMQ). O rendimento dos extratos liofilizados foi de 14,9% para EGMO e de 6,0 % para EGMQ, obtidos pela fórmula:

$$\text{Rendimento da extração (\%)} = \frac{\text{amostra liofilizada} \times 100}{\text{amostra original}}$$

Os extratos obtidos foram mantidos à temperatura de -20°C e protegidos da luz, até a realização das análises.

2.3. Cultura celular

As linhagens celulares utilizadas foram: células mononucleares do sangue periférico humano/*human peripheral blood mononuclear cells* (PBMC); células de rabdomiossarcoma humano (RD); carcinoma pulmonar humano (NCI-H292); células de melanoma humano Sk-mel-19 (mutação no gene B-RAF e CDKN2A), Sk-mel-28 (mutação no gene B-RAF, Tp53, e PTEN) e Sk-mel-103 (mutação no gene N-RAS) e de melanoma murino B16F10-Nex2

(sublinhagem, que possui as mesmas características da linhagem original B16F10, mas com agressividade metastática); e células de leucemia linfóide aguda (Jurkat) e leucemia mieloide crônica (K562). Para as PBMC, B16F10-Nex2, K562 e Jurkat foi utilizado o meio RPMI 1640. As linhagens celulares Sk-mel foram cultivadas em meio DMEM alta glicose. Todas as linhagens celulares (exceto PBMC) foram mantidas em frascos de cultivo celular de 75 cm² contendo seus respectivos meios de cultura, suplementados com 10 nM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico (HEPES), 24 nM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina 5 mg/mL, estreptomicina 5 mg/mL e neomicina 10 mg/mL) e mantidas em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ a 37 °C.

A obtenção das PBMC foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa local da Universidade Federal da Grande Dourados (CEP: 6.166.432). O sangue humano de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio. Em seguida, as PBMC foram isoladas com o uso de Ficoll Histopaque-1077(1,077 g/cm³) (Sigma-Aldrich/Merck, Alemanha). Seguindo as instruções do fabricante, o sangue foi centrifugado a 400 × g por 30 min separando as células mononucleares em interfaces facilmente diferenciadas.

2.4. Ensaio de viabilidade celular MTT

Para investigar os efeitos dos extratos de geoprópolis sobre a viabilidade celular, foi realizado o ensaio colorimétrico com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltiazólio (MTT). Para isto, as PBMC (12 x 10⁴), as células RD e NCI-H292 (1 x 10⁴), SK-mel-19, 28, 103 (7 x 10³), B16-F10-Nex2 (5 x 10³), e Jurkat/K562 (2 x 10⁴), foram plaqueadas em microplacas de 96 poços. Posteriormente, células em suspensão foram tratadas imediatamente após o plaqueamento, e as células aderentes após 24 h, com diferentes concentrações (12,5 a 250 µg/mL) dos extratos de geoprópolis durante 24 e 48 h. Após os períodos de tratamento, as células em suspensão foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Seguindo com os procedimentos, o sobrenadante das placas foi descartado, as diferentes linhagens celulares foram lavadas com PBS 1x (tampão fosfato salino, pH 7,4) e incubadas com o reagente MTT (0,5 mg/mL) durante 4 h, a 37 °C. Após o período de incubação em estufa, os cristais de formazan foram solubilizados em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), e a absorbância das amostras foi mensurada a 630 nm em leitor de microplaca Thermoplate TP-READER. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata e os resultados da viabilidade celular foram obtidos usando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \left(\frac{\text{Abs das células tratadas}}{\text{Abs do controle}} \right) \times 100$$

2.5. Ensaio de ranhura (*Scratch assay*)

Para investigar os efeitos dos extratos de geoprópolis sobre a migração celular, foi realizado o ensaio ranhura, de acordo com Justus et al. (2014). Para isto, as células Sk-Mel-19, Sk-Mel-28, Sk-Mel-103 (5×10^4) e B16F10-Nex2 (4×10^4) foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo meio RPMI suplementado com 1% de SFB e incubadas a 37 °C durante 24 h para formar uma monocamada celular. Após esse período, um risco vertical foi feito no meio do poço utilizando uma ponteira de 200 µL. Em seguida, cada poço foi lavado com 500 µL de PBS e posteriormente as células de melanoma foram tratadas com 1/8 do IC₅₀ do EGMO ou EGMQ diluídos em meio RPMI (1% de SFB) durante 48 h a 37 °C. Cada poço foi fotografado em 3 regiões previamente marcadas com caneta permanente utilizando um microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CKX41; aumento de 40x). A porcentagem de migração celular foi calculada determinando as áreas das imagens nos tempos 0, 12, 24 e 48 h, com auxílio do Software ImageJ. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. Para determinação da porcentagem de migração, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Migração celular (\%)} = \left(\frac{(\text{média do tempo 0} - \text{média do tempo avaliado})}{\text{média do tempo 0}} \right) \times 100$$

2.6. Determinação do perfil de morte celular

Para avaliar o perfil de morte celular promovido pelo EGMO e EGMQ, foi realizada a técnica de citometria de fluxo, utilizando dupla marcação com Anexina V-FITC e 7-aminoactinomicina/Iodeto de Propídio (BD Biosciences), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. As células B16F10-Nex2, Jurkat e K562 (1×10^5) foram tratadas com o IC₅₀ do EGMO e EGMQ durante 24 h. Após este período, as diferentes linhagens foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1x e ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação. Em seguida, foram adicionados 1 µL de anexina V-FITC e 1 µL de 7AAD/iodeto de propídio. A mistura contendo os marcadores e as células foi incubada em estufa de cultivo celular, por 15 minutos. Dez mil eventos foram coletados por amostra e as análises foram realizadas em citômetro de fluxo BD Accuri C6 Plus (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

2.7. Ensaio MTT com inibidores farmacológicos

As células B16F10-Nex2 (5×10^3), Jurkat e K562 (2×10^4) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as células foram pré-incubadas durante 1 hora com 20 μ M do inibidor de pan-caspase Z-VAD-FMK (N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone), 20 μ M do inibidor de caspase-3 Z-DEVD-FMK (benzyloxycarbonyl-Asp(OMe)-Gly(OMe)-Val-Asp(OMe)-chloromethyl ketone) e 20 μ M do inibidor de necroptose necrostatina-1 (NEC-1) (5-(1H-Indol-3-ylmethyl)-3-methyl-2-thioxo-4-imidazolidinone). Após este período, as células foram tratadas com os respectivos IC₅₀ do EGMO ou EGMQ, durante 24 h. Posteriormente, os efeitos sobre a viabilidade celular foram observados utilizando o reagente MTT, método previamente descrito na seção 2.4. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

2.8. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas realizando o *teste t* de Student para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett para comparação de dois ou mais grupos, usando o software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

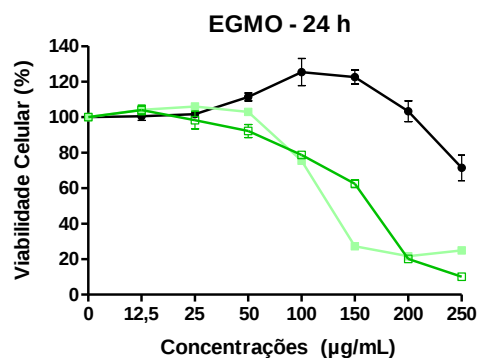
3. Resultados

3.1. Ensaio de viabilidade celular MTT

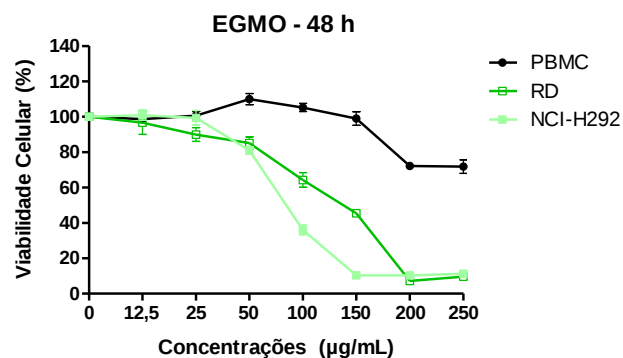
Os resultados mostram que até as maiores concentrações avaliadas de ambos os extratos de geoprópolis, houve a manutenção da viabilidade das PBMC em aproximadamente 70%. Por outro lado, em todas as linhagens cancerígenas avaliadas, os extratos promoveram redução da viabilidade de modo acentuado, conforme observado nas figuras 1, 2 e 3.

Na figura 1A-D, a redução da viabilidade promovida pelo EGMO e EGMQ em células RD foi evidenciada a partir da concentração de 100 μ g/mL, em ambos os períodos avaliados. Na maior concentração avaliada, o EGMO e EGMQ promoveram uma redução de 89 e 84 % e de 90 e 88% da viabilidade celular nos períodos de 24 e 48 h, respectivamente. Nas células NCI-H292, os extratos de geoprópolis reduziram a viabilidade celular a partir de 100 μ g/mL no período de 24 h e a partir de 50 μ g/mL no período de 48 h. Nas maiores concentrações avaliadas, o EGMO e o EGMQ reduziram aproximadamente 75 e 89 % da viabilidade celular nos períodos de 24 e 48 h, respectivamente.

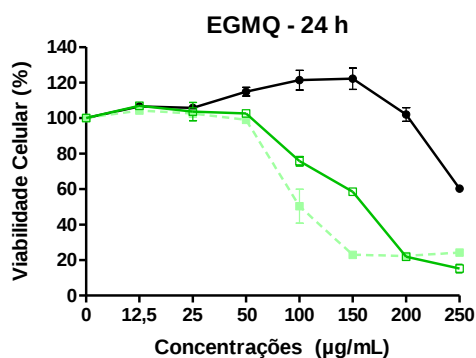
(A)



(B)



(C)



(D)

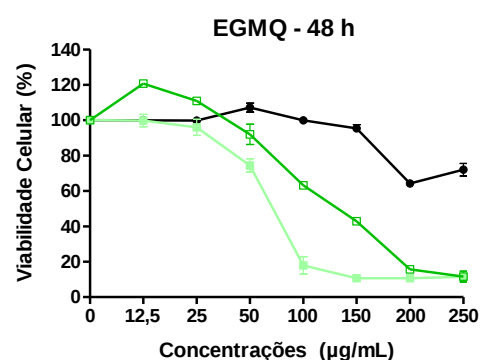


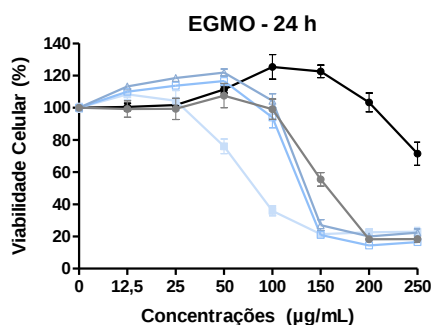
Figura 1. Curva de viabilidade das células normais (PBMC) e das células de rabdomiosarcoma RD e de carcinoma pulmonar NCI-H292 tratadas com o extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. orbigny* (EGMO) nos períodos de 24 (A) e 48 h (B) e com o extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* (EGMQ) nos períodos de 24 (C) e 48 h (D). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM.

Na figura 2A-D, os extratos de geoprópolis reduziram a viabilidade celular de todas as linhagens de melanoma humano e murino. Nas células Sk-mel-19, o EGMO e EGMQ reduziram a viabilidade celular a partir das concentrações de 150 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, ambos os extratos reduziram a viabilidade em aproximadamente 80 e 85%, em 24 e 48 h, respectivamente. Nas células Sk-mel-28, a redução da viabilidade celular promovida por EGMO foi evidenciada a partir da concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ em ambos os períodos avaliados. O EGMQ foi capaz de promover este efeito a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$. Nas maiores concentrações, ambos os extratos reduziram cerca de 80 e 92 % da viabilidade em 24 e 48 h, respectivamente.

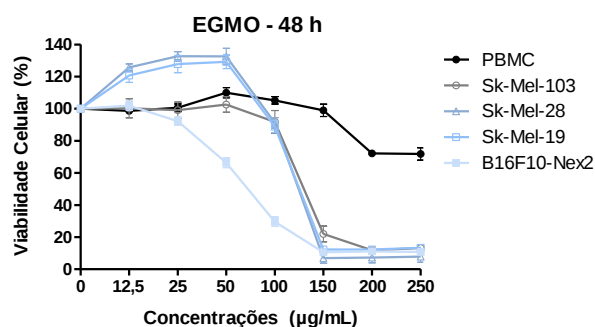
Nas células Sk-mel-103, o EGMO reduziu a viabilidade a partir da concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ em 24 e 48 h. O EGMQ promoveu este efeito a partir de 150 $\mu\text{g/mL}$ em 24 h e a partir

de 100 µg/mL em 48 h. Nas maiores concentrações avaliadas, ambos os extratos reduziram aproximadamente 82 e 87 % da viabilidade celular em 24 e 48 h, respectivamente. Nas células B16F10-Nex2, os extratos de geoprópolis demonstraram efeito mais acentuado na redução da viabilidade celular, induzindo este efeito a partir de 50 µg/mL. Em adição, na concentração de 250 µg/mL, ambos os extratos reduziram aproximadamente 80 e 93 % da viabilidade celular em 24 e 48 h, respectivamente.

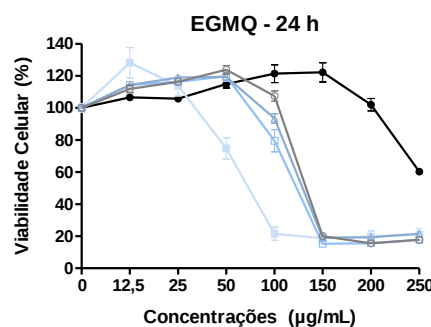
(A)



(B)



(C)



(D)

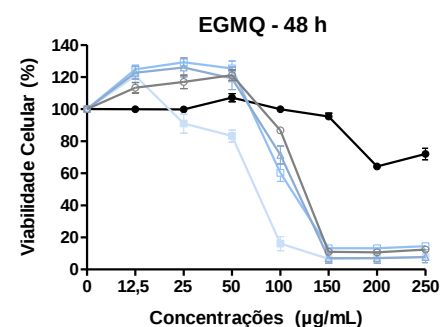


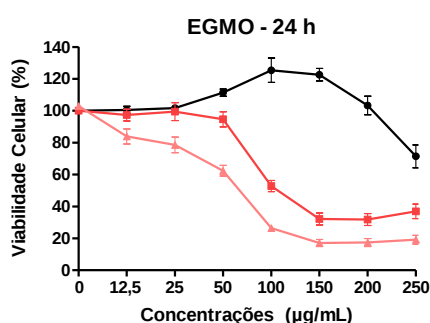
Figura 2. Curva de viabilidade das células normais (PBMC) e das células de melanoma murino B16F10-Nex2 e de melanoma humano Sk-Mel-19, Sk-Mel-28 e Sk-Mel-103 tratadas com o extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. orbigny* (EGMO) nos períodos de 24 (A) e 48 h (B) e com o extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* (EGMQ) nos períodos de 24 (C) e 48 h (D). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM.

Conforme a figura 3, o EGMO reduziu a viabilidade das células Jurkat a partir de 100 e 50 µg/mL em 24 e 48 h, respectivamente. Nas maiores concentrações avaliadas, o EGMO reduziu cerca de 68 e 79 % da viabilidade em 24 e 48 h, respectivamente. O EGMQ foi capaz de reduzir a viabilidade a partir de 50 µg/mL, em ambos os períodos de avaliação. Nas últimas

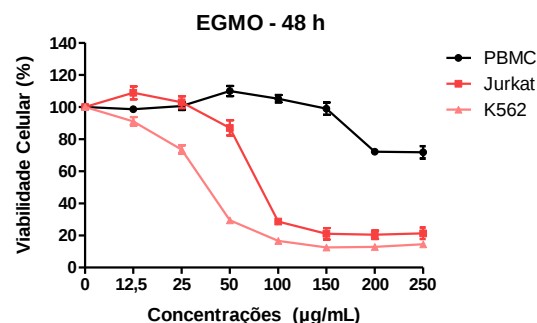
concentrações avaliadas, o extrato reduziu cerca de 72 e 78 % da viabilidade das células Jurkat em 24 e 48 h, respectivamente.

Dentre as linhagens cancerígenas avaliadas, foi observado o efeito mais potente dos extratos na redução da viabilidade das células leucêmicas K562. A redução da viabilidade celular foi constatada em todas as concentrações avaliadas, de maneira concentração dependente e em ambos os extratos e períodos avaliados. Nas maiores concentrações avaliadas, o EGMO reduziu cerca de 81 e 84 % da viabilidade em 24 e 48 h, respectivamente, enquanto o EGMQ reduziu cerca de 75 % (24 h) e 85 % (48 h) da viabilidade celular.

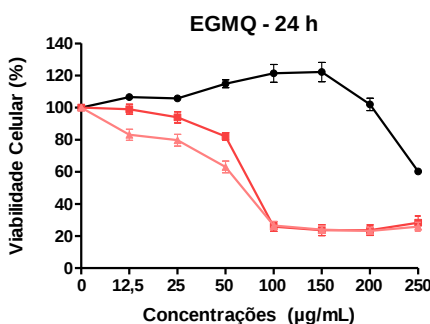
(A)



(B)



(C)



(D)

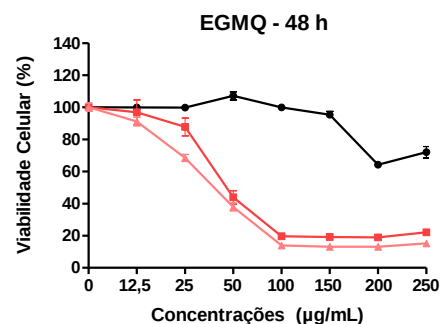


Figura 3. Curva de viabilidade das células normais (PBMC) e das células de leucemia Jurkat e K562 tratadas com o extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) nos períodos de 24 (A) e 48 h (B) e com o extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* (EGMQ) nos períodos de 24 (C) e 48 h (D). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM.

Com base nos valores de IC_{50} apresentados na tabela 1, demonstra-se que as linhagens celulares que apresentaram maior sensibilidade à ação do EGMO foram, em ordem crescente: RD, Sk-mel-103, Sk-mel-28, Sk-mel-19, NCI-H292, Jurkat, B16F10-Nex2 e K562. Já para EGMQ, as células mais sensíveis foram RD, Sk-mel-103, Sk-mel-28, Sk-mel-19, NCI-H292,

B16F10-Nex2, Jurkat e K562. Os valores de IC₅₀ não foram detectados em células normais PBMC.

Tabela 1. Valores de IC₅₀ do EGMO e EGMQ obtidos em linhagens celulares de rabdomiossarcoma humano (RD), carcinoma pulmonar humano (NCI-H292), melanoma humano (Sk-mel-103, Sk-mel-28, Sk-mel-19), melanoma murino (B16F10-Nex2) e em leucemia humana (Jurkat e K562).

Linhagem celular	IC ₅₀ (µg/mL)			
	EGMO		EGMQ	
	24 h	48 h	24 h	48 h
PBMC	ND	ND	ND	ND
RD	163,3 ± 3,6	136,9 ± 1,2	160 ± 2,9	130,4 ± 8,5
NCI-H292	124,3 ± 2,2	78,4 ± 8,0	115,3 ± 0,4	71,1 ± 6,5
Sk-mel-103	151 ± 4,1	126,6 ± 1,5	128 ± 1,8	122 ± 0,6
Sk-mel-28	132,9 ± 4,4	122 ± 3,2	126,6 ± 2,6	114 ± 6,2
Sk-mel-19	126,05 ± 4,6	122,4 ± 1,5	118,2 ± 5,5	106 ± 6,4
B16F10-Nex2	65,3 ± 2,5	62,2 ± 1,4	61,2 ± 2,2	66,6 ± 2,4
Jurkat	105 ± 9,8	77 ± 2,7	74,8 ± 4,1	38,6 ± 4,3
K562	65,5 ± 2,3	34,9 ± 1,5	61,1 ± 1,7	35,7 ± 2,0

IC₅₀: Concentração inibitória para 50% das células.

EGMO: extrato hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona orbignyi*.

EGMQ: extrato hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

ND: não detectado.

Valores foram expressos como média ± EPM, onde n=3.

Adicionalmente, em comparação às células normais, as atividades máximas (maior concentração citotóxica) do EGMO promoveram uma redução da viabilidade das linhagens cancerígenas cerca de 2,3 a 7 vezes maior em 24 h e cerca de 2,5 a 10 vezes maior em 48 h (tabela 2). Já as atividades máximas do EGMQ promoveram uma redução da viabilidade das linhagens cancerígenas cerca de 2,2 a 4 vezes maior em 24 h e cerca de 3,6 a 10 vezes maior em 48 h (tabela 2). Estes dados indicam maior seletividade de ambos os extratos de geoprópolis para as células cancerígenas.

Tabela 2. Valores de atividade máxima em relação a redução da viabilidade celular obtidos por meio do tratamento com os extratos hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona orbignyi* e (EGMO) e de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ) em células PBMC e em linhagens celulares de melanoma humano (Sk-mel-103, Sk-mel-28, Sk-mel-19), melanoma murino (B16F10-Nex2) e de leucemia humana (Jurkat e K562).

Amostra	Viabilidade celular – Ensaio MTT							
	EGMO				EGMQ			
	Atividade máxima – 24 h		Atividade máxima – 48 h		Atividade máxima – 24 h		Atividade máxima – 48 h	
Linhagem Celular	%	%	µg/mL	%	µg/mL	µg/mL	%	µg/mL
PBMC	71 ± 7,6	250	72 ± 1,0	200	60 ± 1,1	250	71,9 ± 3,5	250
RD	10 ± 0,7	250	7,1 ± 1,3	200	15 ± 2,3	250	15,7 ± 0,1	200
NCI-H292	27,2 ± 1,9	150	10,3 ± 0,6	150	22,2 ± 1,0	150	10,7 ± 0,4	150
Sk-mel-103	18,2 ± 1,1	200	11,8 ± 0,1	150	19,9 ± 1,7	150	11 ± 0,5	150
Sk-mel-28	27,0 ± 3,3	150	6,9 ± 3,1	150	19,1 ± 1,5	150	7,0 ± 3,1	150
Sk-mel-19	20,8 ± 1,9	150	12,3 ± 1,4	150	15,2 ± 0,6	150	13,2 ± 1,5	200
B16F10-Nex2	21,4 ± 2,1	150	10,5 ± 0,6	150	21,4 ± 4,0	100	16,1 ± 4,3	100
Jurkat	30,1 ± 3,7	150	28,6 ± 0,4	100	25,8 ± 2,9	100	19,7 ± 0,6	100
K562	26,4 ± 0,5	100	16,6 ± 1,3	100	26,5 ± 2,4	100	13,9 ± 0,5	100

Valores foram expressos como média ± EPM, onde n=3.

3.2. Ensaio de ranhura (*Scratch assay*)

As células de melanoma são altamente metastáticas, principalmente a linhagem B16F10-Nex2. Neste sentido, todas as células de melanoma foram selecionadas para a realização deste ensaio. Para investigar os efeitos dos extratos sobre a migração celular, as células foram tratadas com $1/8$ de todos os valores de IC_{50} obtidos no ensaio de viabilidade celular, visto que concentrações maiores promovem citotoxicidade.

Conforme as figuras 4, 5, 6 e 7, observa-se a diminuição significativa da migração celular promovida pelo EGMO e EGMQ em todas as linhagens de melanoma avaliadas. Os valores de migração em percentual, do controle e tratamentos, para cada linhagem analisada encontram-se na tabela 3. Em comparação aos controles, o EGMO reduziu a migração celular em 31,9 % nas células Sk-mel-103 (fig. 4B), em 35,2 % nas células Sk-mel-19 (fig. 6B), em 42,1 % nas células Sk-mel-28 (fig. 5B) e em 53,1 % nas células B16F10-Nex2 (fig. 7B). O EGMQ reduziu a migração celular em 28,5 % nas células Sk-mel-103 (fig. 4B), em 45,3 % nas células Sk-mel-28 (fig. 5B) e B16F10-Nex2 (fig. 7B) e em 46,1 % nas células Sk-mel-19 (fig. 6B).

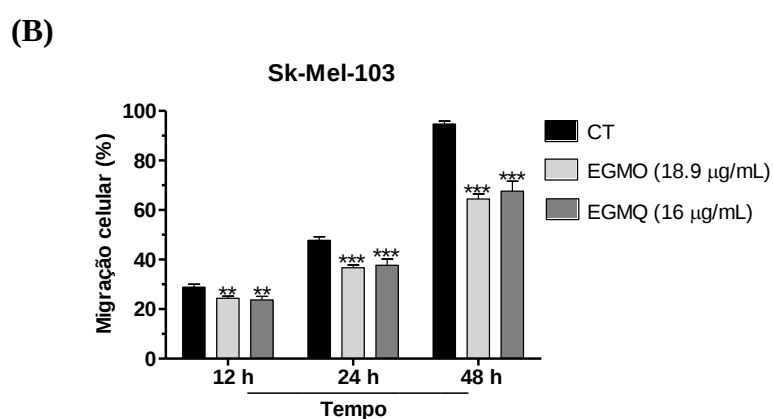
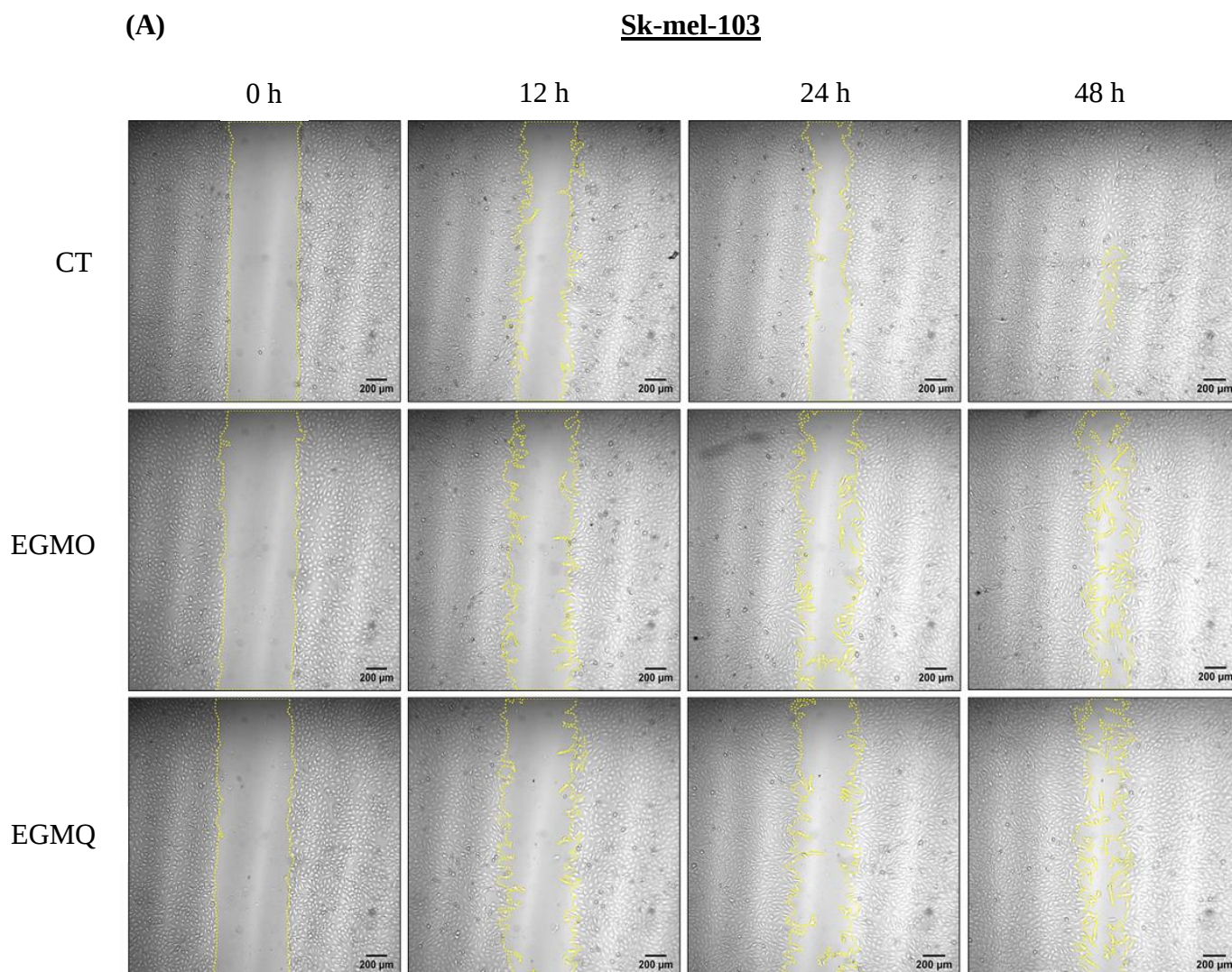


Figura 4. Migração celular das células de melanoma humano Sk-Mel-103 tratadas com $\frac{1}{8}$ do valor do IC_{50} do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) e do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* (EGMQ). (A) Imagens representativas da migração celular obtidas através do ensaio de ranhura (*scratch assay*), utilizando o aumento de 40x. (B) Percentuais de migração celular após 12, 24 e 48 h de tratamento. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. *** $p <$ comparados ao controle sem tratamento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

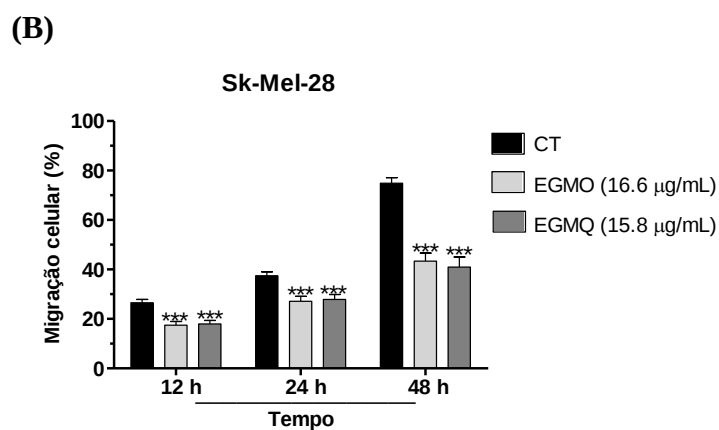
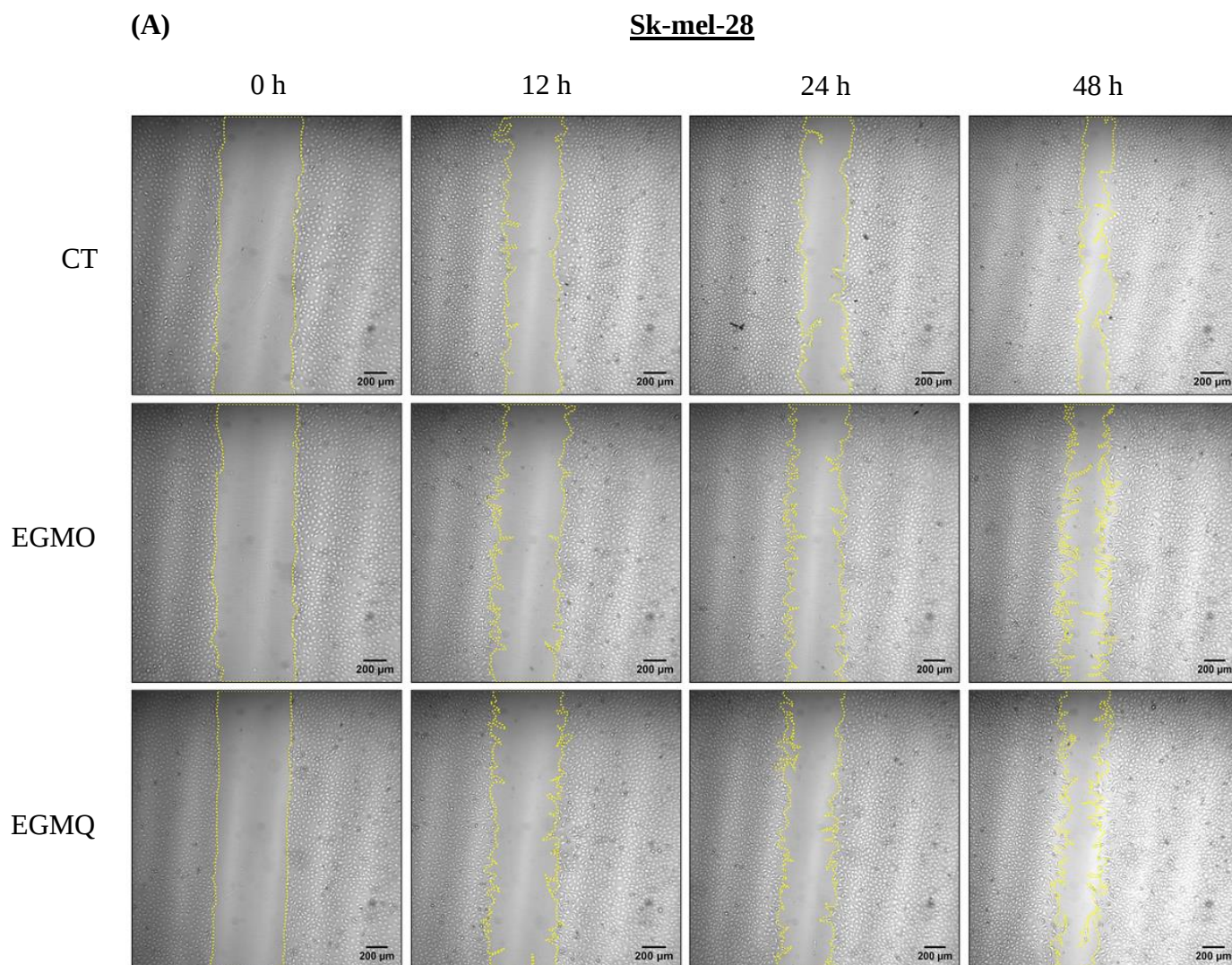


Figura 5. Migração celular das células de melanoma humano Sk-Mel-28 tratadas com $\frac{1}{8}$ do valor do IC_{50} do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. orbigny* (EGMO) e do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* (EGMQ). (A) Imagens representativas da migração celular obtidas através do ensaio de ranhura (*scratch assay*), utilizando o aumento de 40x. (B) Percentuais de migração celular após 12, 24 e 48 h de tratamento. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ comparados ao controle sem tratamento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

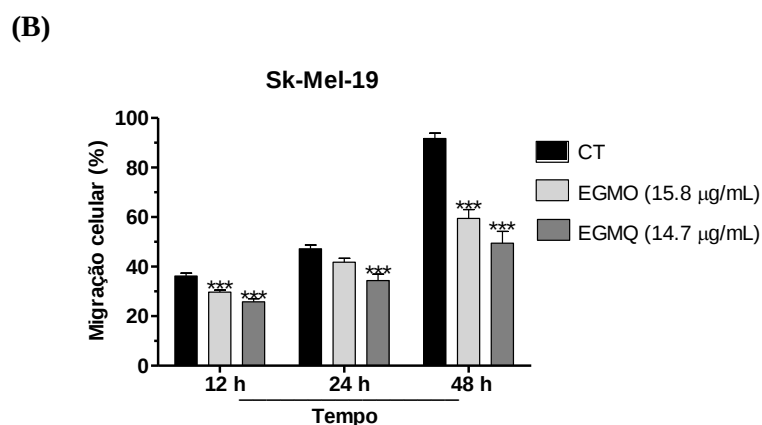
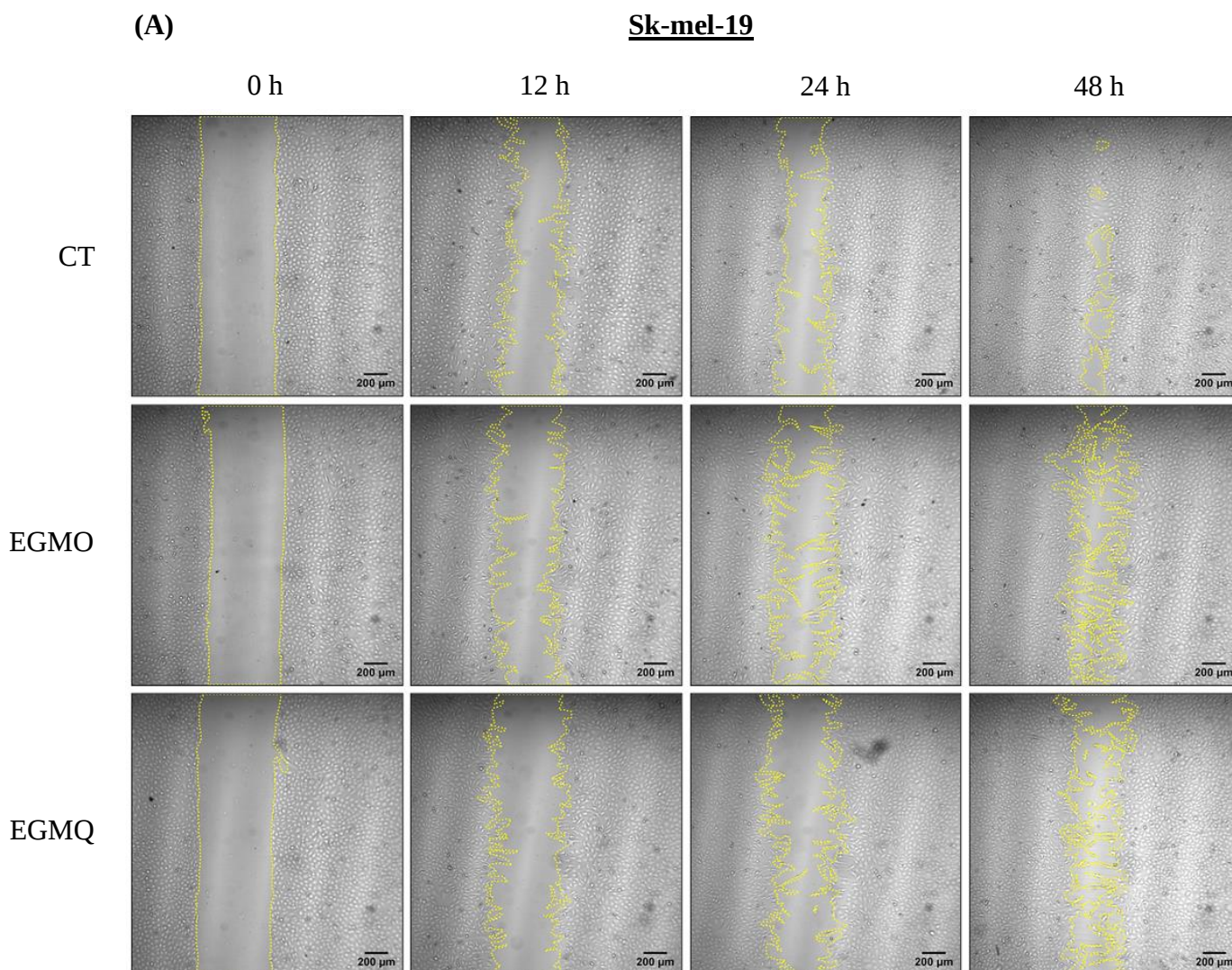


Figura 6. Migração celular das células de melanoma humano Sk-Mel-19 tratadas com $\frac{1}{8}$ do valor do IC_{50} do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. orbigny* (EGMO) e do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* (EGMQ). (A) Imagens representativas da migração celular obtidas através do ensaio de ranhura (*scratch assay*), utilizando o aumento de 40x. (B) Percentuais de migração celular após 12, 24 e 48 h de tratamento. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ comparados ao controle sem tratamento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

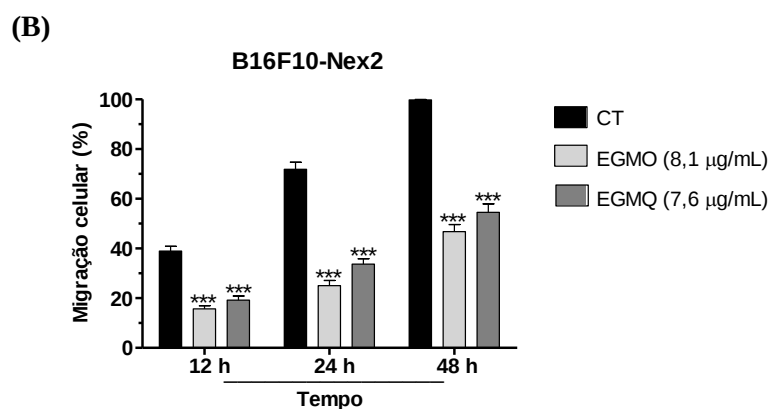
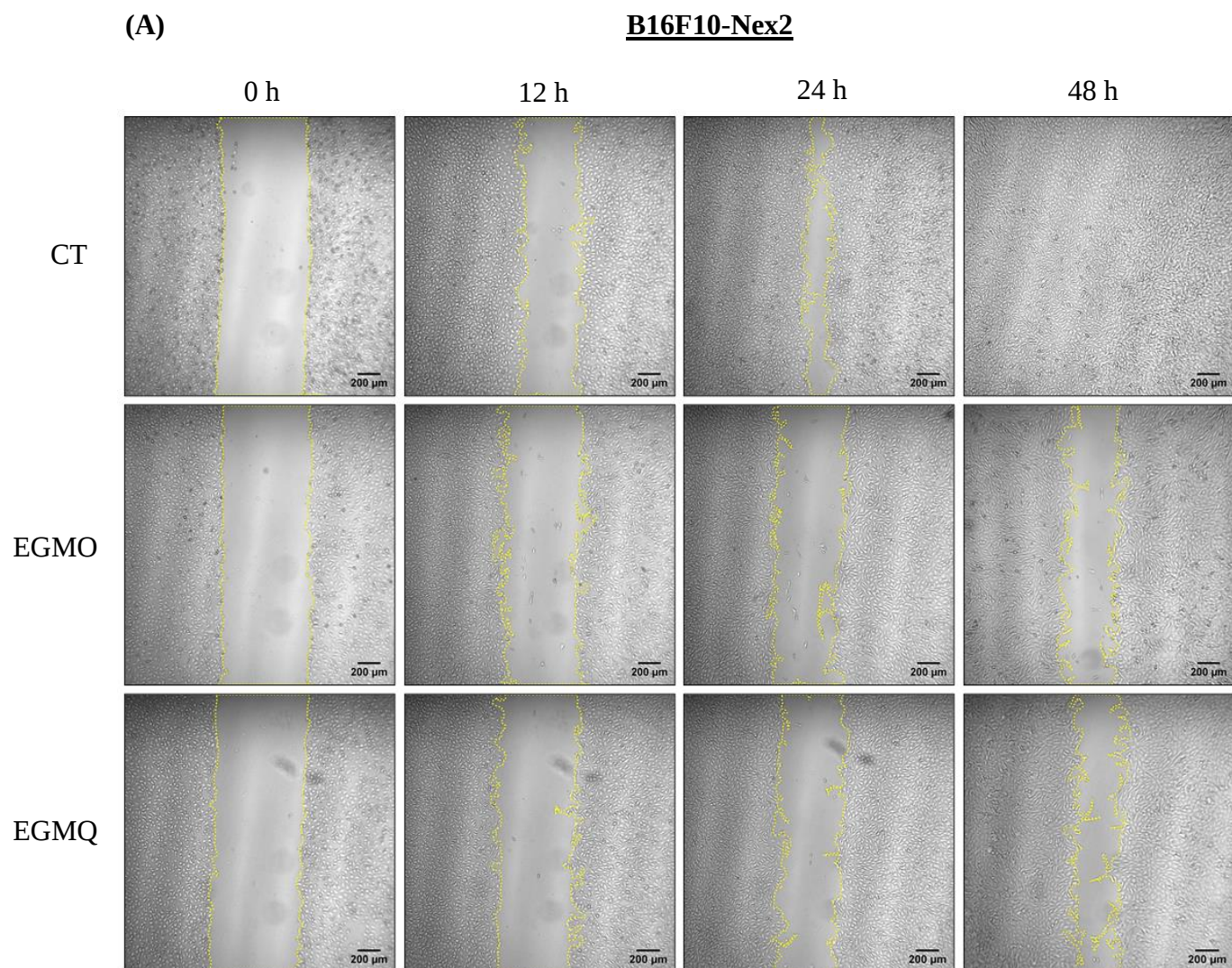


Figura 7. Migração celular das células de melanoma humano B16F10-Nex2 tratadas com $\frac{1}{8}$ do valor do IC_{50} do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) e do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *M. q. anthidioides* (EGMQ). (A) Imagens representativas da migração celular obtidas através do ensaio de ranhura (*scratch assay*), utilizando o aumento de 40x. (B) Percentuais de migração celular após 12, 24 e 48 h de tratamento. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ comparados ao controle sem tratamento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 3. Porcentagem da migração celular das linhagens de melanoma humano Sk-mel-103, Sk-mel-28, Sk-mel-19 e melanoma murino B16F10-Nex2, após os tratamentos durante 48 h com $1/8$ do IC₅₀ de EGMO e EGMQ.

Grupo	Migração celular %								
	Controle			EGMO $1/8$ IC ₅₀ (µg/mL)			EGMQ $1/8$ IC ₅₀ (µg/mL)		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
Linhagem celular									
Sk-mel-103	28,8	47,7	94,6	24,3a	36,7b	64,4c	23,6a	37,7b	67,6c
Sk-mel-28	26,5	37,4	74,8	17,4a	27b	43,3c	17,9a	27,8b	40,9c
Sk-mel-19	36,2	47,2	91,7	29,7a	41,7	59,4c	25,7a	34,4b	49,4c
B16F10-Nex2	38,9	71,8	99,8	15,6 ^a	25b	46,8c	19,2a	33,7b	54,5c

$1/8$ IC₅₀: Um oitavo da concentração inibitória para 50% das células

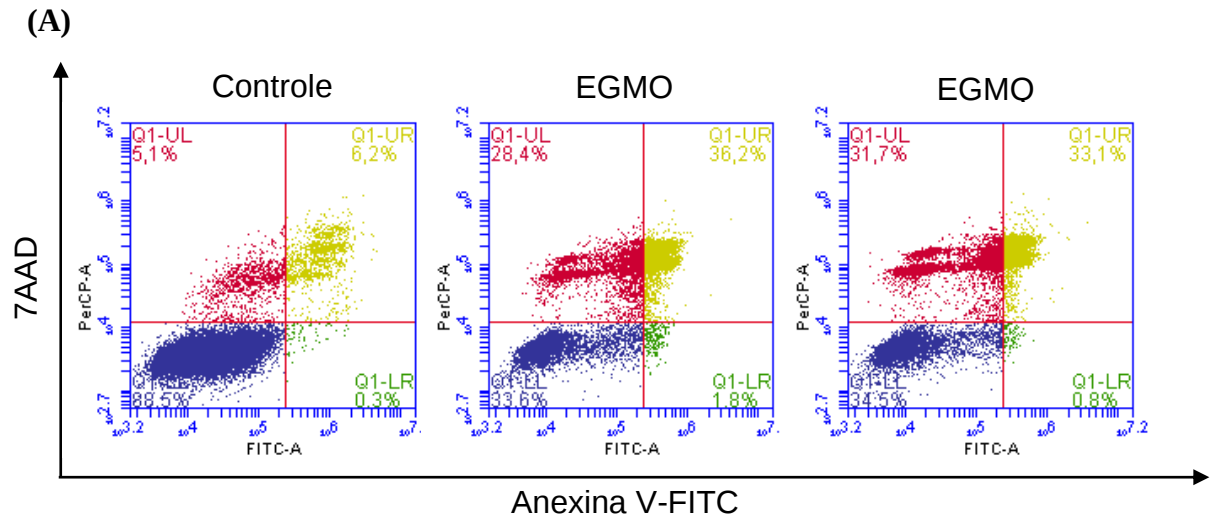
Valores foram expressos como média $\pm$ EPM, onde n=3.

Letras a, b e c: indicam diferença estatística quando comparado ao grupo controle nos respectivos períodos de 12, 24 e 48 h.

3.3. Determinação do perfil de morte celular

As linhagens de melanoma murino e leucemia foram as mais sensíveis frente aos efeitos de redução da viabilidade celular promovidos pelos extratos de geoprópolis. Para evidenciar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade promovida pelos extratos, foram utilizados os marcadores fluorescentes Anexina V-FITC, 7AAD e Iodeto de Propídeo.

Na linhagem B16F10-Nex2, como mostra a figura 9A e B, foi constatado que os extratos de geoprópolis promoveram predominantemente morte por apoptose tardia, seguida de necrose. O EGMO induziu respectivamente 35,5 e 21,9 % de apoptose tardia e necrose nas células B16F10-Nex2. O perfil de morte celular promovido pelo EGMQ foi 42,2 % de apoptose tardia e 21,4 % de necrose.



(B)

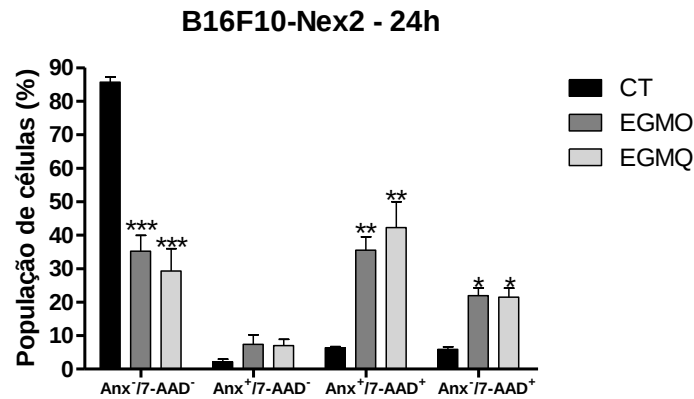


Figura 9. Perfil de morte em células B16F10-Nex2 após tratamento com os extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *Melipona orbignyi* (EGMO) e de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ). (A) Dotplots representativos, obtidos via citometria de fluxo de células marcadas com anexina V-FITC (Anx) e 7-aminoactinomicina (7-AAD), tratadas com 65,3 µg/mL do EGMO e 61,1 µg/mL de EGMQ. (B) Percentual de morte celular obtido através dos dotplots correspondentes às células controle e às células tratadas com EGMO e EGMQ. ** $p < 0,01$, e *** $p < 0,001$ quando o grupo tratado foi comparado ao grupo controle sem tratamento

O perfil de morte celular de apoptose tardia e necrose também foi observado na linhagem de leucemia Jurkat, como observado na figura 10A-B. O EGMO promoveu majoritariamente a morte celular por apoptose tardia (28,8 %) nas células Jurkat, enquanto 14,4 % das células morreram por necrose. Similarmente, o EGMQ promoveu perfil de morte celular majoritariamente por apoptose tardia (28,5 %), seguida de necrose (19%).

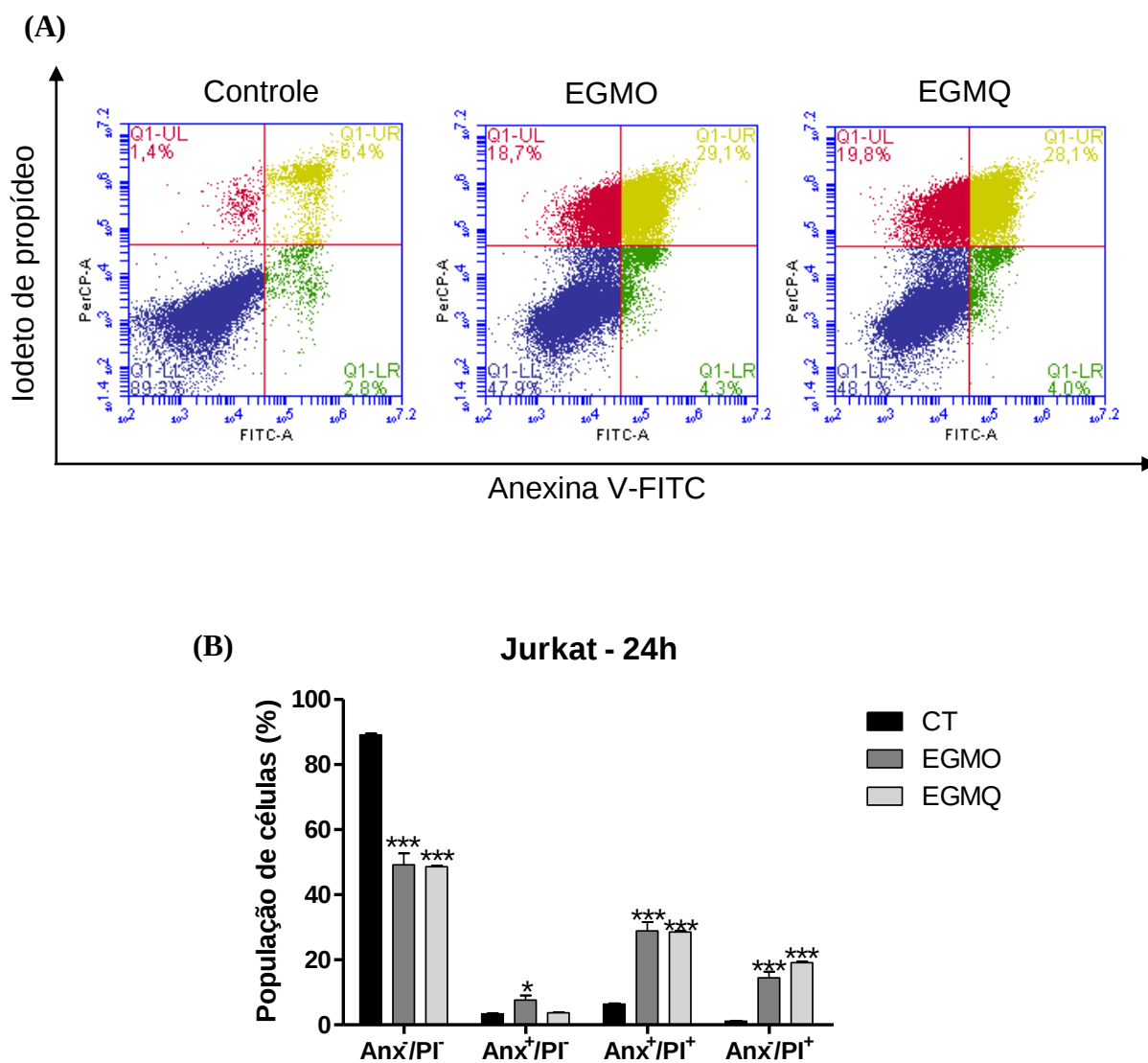


Figura 10. Perfil de morte em células Jurkat após tratamento com os extratos hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona orbignyi* (EGMO) e de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ). (A) Dotplots representativos, obtidos via citometria de fluxo de células marcadas com anexina V-FITC (Anx) e iodeto de propídeo (PI), tratadas com 105 µg/mL do EGMO e 74,8 µg/mL de EGMQ. (B) Percentual de morte celular obtido através dos dotplots correspondentes às células controle e às células tratadas com EGMO e EGMQ. ** p < 0,01, e *** p < 0,001 quando o grupo tratado foi comparado ao grupo controle sem tratamento.

Diferentemente, na linhagem K562, ambos os extratos de geoprópolis foram capazes de induzir morte celular por apoptose inicial, sem a constatação de células em necrose. Os dados

mostram uma população de 24,6 e 54,6 % de células em apoptose, após 24 h de tratamento com EGMO e EGMQ, respectivamente (figura 11 A e B).

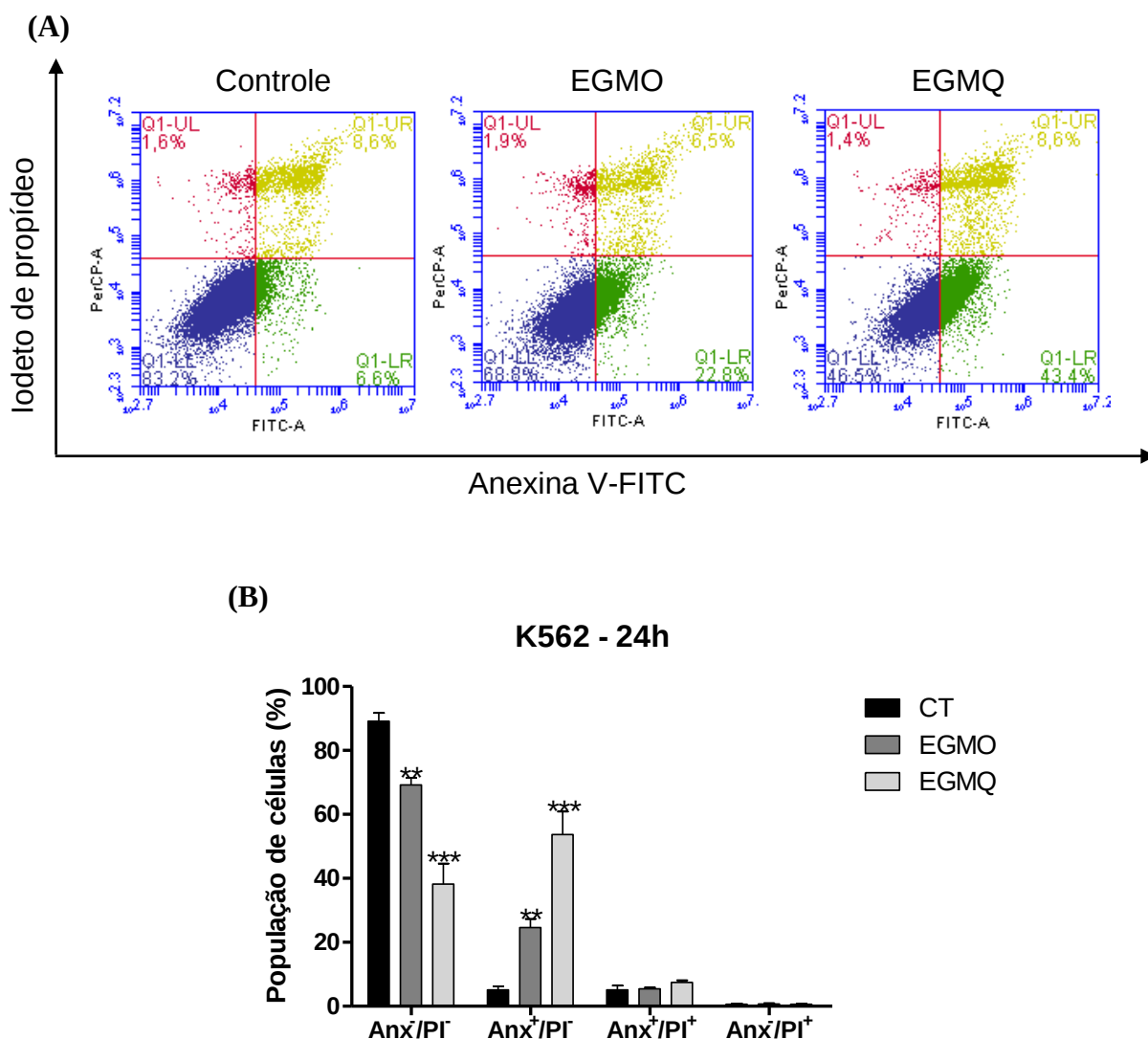


Figura 11. Perfil de morte em células K562 após tratamento com os extratos hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona orbignyi* (EGMO) e de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ). (A) Dotplots representativos, obtidos via citometria de fluxo de células marcadas com anexina V-FITC (Anx) e iodeto de propídeo (PI), tratadas com 65,5 µg/mL do EGMO e 61,1 µg/mL de EGMQ. (B) Percentual de morte celular obtido através dos dotplots correspondentes às células controle e às células tratadas com EGMO e EGMQ. ** p < 0,01, e *** p < 0,001 quando o grupo tratado foi comparado ao grupo controle sem tratamento.

3.4. Ensaio MTT com inibidores farmacológicos

Para confirmação dos mecanismos de citotoxicidade, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, com a presença de inibidores farmacológicos que bloqueiam a ação de moléculas específicas que participam de vias de sinalização de morte celular. Através da inibição de moléculas específicas, confirmou-se a capacidade dos extratos de geoprópolis em

ativar vias de sinalização de morte por apoptose e necroptose. Estes resultados estão apresentados nas figuras 12A-F.

As células B16F10-Nex2 quando tratadas somente com o IC₅₀ do EGMO e EGMO apresentaram respectivamente 55,3 e 57,2 % de viabilidade. Na presença dos inibidores houve uma reversão parcial da citotoxicidade promovida pelos extratos de geoprópolis, como mostra a figura 12A-B. Ao serem incubadas com inibidores Z-VAD-FMK, Z-DEVD, NEC-1 e tratadas com o EGMO, as células B16F10-Nex2 apresentaram $63,3 \pm 1,0$; $62 \pm 1,4$ e $64 \pm 2,3$ % de viabilidade, respectivamente. As células tratadas com EGMQ na presença dos inibidores apresentaram viabilidade de $70,9 \pm 1,8$ (Z-VAD-FMK), $71,3 \pm 2,6$ (Z-VAD-FMK) e $70 \pm 1,4$ % (NEC-1) de viabilidade.

As células Jurkat, quando tratadas somente com o IC₅₀ de EGMO e EGMQ, apresentaram $38,6 \pm 2,0$ % e $52,1 \pm 2,7$ % de viabilidade, respectivamente. A figura 12C-D, mostra que todos os inibidores promoveram uma reversão parcial significativa do efeito citotóxico induzido pelos extratos. Ao serem tratadas com EGMO na presença dos inibidores, as células Jurkat apresentaram viabilidade de $52,1 \pm 0,8$ (Z-VAD-FMK), $45,9 \pm 0,8$ (Z-DEVD) e $48,6 \pm 1,6$ % (NEC-1). As células tratadas com EGMQ na presença dos inibidores apresentaram viabilidade de $69 \pm 1,8$ (Z-VAD-FMK), $67,5 \pm 3,4$ (Z-DEVD) e $65,7 \pm 2,4$ % (NEC-1).

Em relação a linhagem K562, quando tratadas somente com o IC₅₀ do EGMO e EGMQ, apresentaram $45,6 \pm 2,7$ e $38,8 \pm 2,3$ % de viabilidade, respectivamente. A figura 12E-F mostra que os inibidores farmacológicos Z-VAD-FMK e Z-DEVD, promoveram uma reversão parcial significativa do efeito citotóxico induzido pelos extratos. As células K562 tratadas com EGMO na presença dos inibidores apresentaram viabilidade de $57,7 \pm 3,8$ (Z-VAD-FMK) e $55,4 \pm 1,5$ % (Z-DEVD). As células tratadas com EGMQ na presença dos inibidores apresentaram viabilidade de $49,2 \pm 2,5$ (Z-VAD-FMK) e $50,8 \pm 1,2$ % (Z-DEVD). Em relação à ativação da via de sinalização necroptótica, não foram observadas alterações significativas com o uso do inibidor NEC-1.

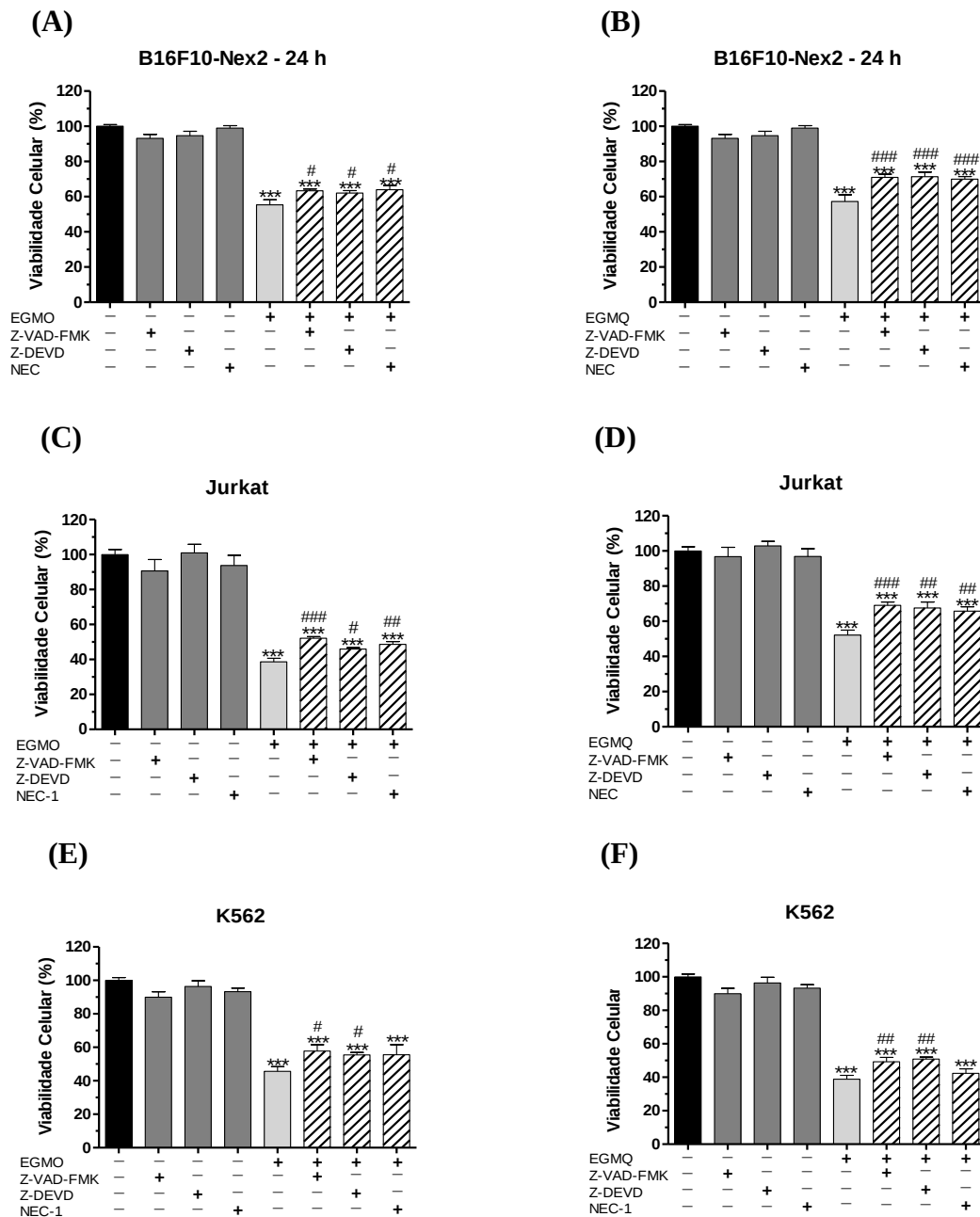


Figura 12. Viabilidade das linhagens de melanoma murino B16F10-Nex2 e de leucemia Jurkat e K562 tratadas com os respectivos IC_{50} do extrato hidroetanólico de geoprópolis de *Melipona orbignyi* (EGMO) e do extrato de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ) na presença dos inibidores de pan-caspase (Z-VAD-FMK), caspase-3 (Z-DEVD) e RIPK-1 (NEC-1). Células B16F10-Nex2 tratadas com EGMO (A), e EGMQ (B), células Jurkat tratadas com EGMO (C) e EGMQ, (D) e células K562 tratadas com EGMO (E) e EGMQ (F) após o período de 24 h. Valores foram expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ comparados ao controle sem tratamento. # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ comparados às células tratadas somente com EGMO ou EGMQ.

4. Discussão

Ao longo da história, os produtos naturais exerceram e ainda exercem um papel essencial na manutenção da saúde humana, sendo principalmente utilizados no tratamento de doenças. Dentre as 1.881 drogas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA), cerca de 37,9 % são provenientes ou derivadas de produtos naturais, este número se torna mais

notável em relação aos medicamentos anticâncer, onde 52,3 % das drogas disponíveis no mercado são provenientes de produtos naturais ou derivados destes (Newman & Cragg, 2020). Apesar do expressivo fato, o potencial farmacológico dos produtos naturais ainda permanece pouco explorado, tendo em vista a vasta biodiversidade existente no mundo.

Dentre os produtos naturais, a geoprópolis é produzida por algumas espécies de abelhas sem ferrão, por meio da mistura de resinas vegetais, secreções mandibulares, pólen, cera e terra (Dutra *et al.*, 2019). Dando continuidade aos estudos prévios (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b), este trabalho avaliou a ação anticâncer dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. orbignyi* (EGMO) e de *M. q. anthidioides* (EGMQ).

Neste estudo, os extratos e geoprópolis demonstraram relevante ação citotóxica sobre diferentes linhagens de células cancerígenas, com destaque para as células de melanoma murino e leucemia. Nenhum outro registro sobre os efeitos citotóxicos da geoprópolis produzida por *M. orbignyi* foi encontrado na literatura. Sobre a geoprópolis de *M. q. anthidioides*, foi investigada a ação antiproliferativa, em células de câncer de rim, cólon, próstata, mama, cérebro, ovário, de melanoma e leucemia (Rubinho *et al.*, 2019). Outros estudos sobre o potencial anticâncer foram conduzidos com a geoprópolis da espécie *M. fasciculata*, em células de osteosarcoma canino (Cinegaglia *et al.*, 2013) e em células de câncer de laringe (Bartolomeu *et al.*, 2016). Entretanto, nenhum dos referidos estudos verificou o efeito citotóxico sobre células saudáveis.

Neste estudo, ao contrário do observado nas células cancerígenas, o EGMO e EGMQ apresentaram pouca influência sobre a viabilidade de células saudáveis. Na maior concentração avaliada (250 µg/mL) após 48 h, a viabilidade das PBMC estava acima de 70%. A alta citotoxicidade desencadeada por drogas quimioterápicas em células saudáveis é o fator promotor de inúmeros efeitos adversos. Portanto, um parâmetro importante para a descoberta de novos agentes anticancerígenos é a seletividade, buscando efeitos mínimos em células normais, e consequentemente melhoria na qualidade de vida de pacientes.

A geoprópolis apresenta uma composição química complexa, que pode variar de acordo com a região geográfica, clima, flora e espécies de abelhas (Siqueira *et al.*, 2020). Na literatura, alguns estudos reportam a presença de ácidos fenólicos (Zhao *et al.*, 2017), flavonoides (Ferreira *et al.*, 2019), taninos (Dutra *et al.*, 2019), terpenos (Santos *et al.*, 2017a), alcaloides (Coelho *et al.*, 2015), benzofenonas, cumarinas (Cunha *et al.*, 2016) e alquilresorcinóis (Araújo *et al.*, 2016). Todas estas substâncias estão associadas a diferentes atividades biológicas, como a ação anticâncer. Santos *et al.* (2017a) e Santos *et al.* (2017b), identificaram a presença de

derivados de ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos nos extratos de geoprópolis de *M. orbigny* e *M. q. anthidioides*. Nesta perspectiva, a citotoxicidade promovida pelo EGMO e EGMQ pode estar associada aos seus constituintes químicos.

Além do efeito citotóxico, nosso estudo demonstrou pela primeira vez o efeito inibitório dos extratos de geoprópolis de *M. orbigny* e *M. q. anthidioides* sobre a migração de células de melanoma. Além da agressividade, o melanoma possui alto potencial em gerar metástases, responsáveis pela maioria das mortes por câncer (Aiello *et al.*, 2018; Marie *et al.*, 2020). Uma etapa crítica na iniciação das metástases é a transição epitélio-mesenquimal (Li *et al.*, 2019), onde as células perdem proteínas de junção de células epiteliais (E-caderinas, ocludinas e citoqueratinas) e passam a expressar proteínas mesenquimais (N-caderinas, vimentinas e fibronectinas) (Mittal, 2018), induzindo a perda da adesão célula-célula e remodelação do citoesqueleto celular (Zhang *et al.*, 2013; Basu *et al.*, 2018). A transição epitélio-mesequimal é um processo crucial pelo qual células tumorais adquirem capacidades de migração e invasão (Zhang *et al.*, 2013; Ma & Zhang, 2019).

A habilidade de migração é utilizada em diferentes estágios do processo metastático (Anderson *et al.*, 2019), e permite que células de um tumor primário se disseminem pela circulação sanguínea ou linfática e invadam outras regiões do corpo (Nobili *et al.*, 2020). A inibição desta capacidade em células tumorais pode ter um efeito significativo na prevenção de metástases. O efeito sobre a migração de células de câncer de laringe também foi investigado por Bartolomeu *et al.* (2016), utilizando o extrato da geoprópolis de *M. fasciculata*. Em comparação, nós investigamos este efeito utilizando concentrações subletais do EGMO e EGMQ, parâmetro que indica potente ação inibitória sobre a migração das células de melanoma.

Em relação a citotoxicidade promovida por EGMO e EGMQ nas linhagens celulares B16F10-Nex2, Jurkat e K562, evidenciou-se a ativação de vias de sinalização de morte por apoptose e necroptose. Ao analisarmos o perfil de morte nas linhagens B16F10-Nex2 e Jurkat, foi observada a predominância de morte celular por apoptose, especialmente apoptose tardia. Este tipo de morte apresenta características morfológicas bioquímicas da apoptose e da necrose (Silva *et al.*, 2010), e ocorre devido a falha ou ausência de fagocitose (Sachet *et al.*, 2017). Neste processo, a clivagem e ativação de proteínas específicas induzem a formação de poros na membrana e promovem sua permeabilização (Rogers *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

Em ambas as vias extrínseca e intrínseca da apoptose, ocorre a ativação de caspases iniciadoras, que convergem na ativação das caspases executoras 3 e 7 (Suhaili *et al.*, 2017).

Enquanto na necrose, mecanismo de morte não regulado e independente de energia, não existe atuação destas enzimas (Khalid & Azimpouran, 2021). No entanto, em condições de inibição da caspase 8, a necrose pode ocorrer de maneira regulada, em um processo denominado necroptose (Chen *et al.*, 2019). Com o uso de inibidores, confirmamos que EGMO e o EGMQ promovem apoptose e necroptose em células B16F10-Nex2 e Jurkat. A ativação de caspases e da proteína RIPK-1 estão respectivamente envolvidas nestes processos.

Ao observarmos o perfil de morte promovido pelos extratos na linhagem K562, é possível identificar a promoção de apoptose inicial. Um sinal da cascata apoptótica ativa é a externalização da fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana (Perez *et al.*, 2023), cuja marcação ocorre pela anexina V-FITC. A marcação apenas por este fluorocromo é indicativo de apoptose inicial, sendo mantida a integridade da membrana celular.

A indução de morte celular frente as linhagens B16F10-nex2, Jurkat e K562 pode ser atribuída a presença de moléculas bioativas no EGMO e EGMQ. Compostos fenólicos e flavonoides presentes em extratos de produtos naturais são detentores de uma grande diversidade estrutural de moléculas, capazes de desencadear diferentes mecanismos de ação anticâncer (Huang *et al.*, 2009; Chahar *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2021). Dentre as classes químicas já identificadas previamente nos extratos (Santos *et al.*, 2017a; Santos *et al.*, 2017b), derivados de ácidos fenólicos podem promover apoptose e parada do ciclo celular em células tumorais (Chiang *et al.*, 2014; Saleem *et al.*, 2022). Os flavonoides presentes no EGMO e EGMQ possuem importante ação anticâncer relatada na literatura. Dentre estes, a aromadendrina apresenta citotoxicidade em células de câncer de pulmão (Jeon *et al.*, 2008), de mama (Elghondakly *et al.*, 2020), e induz apoptose e necrose em células de câncer de cólon multirresistentes (Wesolowska *et al.*, 2012).

A naringerina possui ação sobre vários tipos de câncer, tais como câncer de pâncreas, fígado, cérebro, colorretal, próstata, gástrico, mama, leucemias e melanoma (Motallebi *et al.*, 2022). Dentre seus mecanismos de ação anticâncer estão a indução de apoptose (extrínseca e intrínseca), parada do ciclo celular, inibição de angiogênese, bloqueio de vias de sinalização de crescimento e proliferação celular (Faramarzi *et al.*, 2022; Stabrauskiene *et al.*, 2022) e inibição da migração celular e invasão de células altamente metastáticas, reduzindo a expressão do gene *SCN9A*, que codifica canais de sódio dependente de voltagem (Aktas & Akgun, 2018). Em adição, os terpenos também são extensivamente investigados e apresentam variados efeitos anticâncer, tais como indução de apoptose, necrose, autofagia, ferroptose, parada do ciclo

celular e inibição da migração e invasão (Tomko *et al.*, 2020; Catanzaro *et al.*, 2022; Wróblewska-Łuczka, 2023).

Ácidos fenólicos e terpenos também foram identificados por Campos *et al.* (2014), na própolis produzida por *M. orbignyi*. Neste estudo, o extrato de própolis de *M. orbignyi* na concentração de 250 µg/mL, promoveu 38,5% de morte das células K562, cujo mecanismo majoritário de morte celular observado foi a necrose. Em comparação, o EGMO em uma concentração cerca de quatro vezes menor, promoveu 24,6% de morte das células K562, sendo a apoptose o mecanismo de morte.

De modo geral, células cancerígenas apresentam o ciclo celular desregulado em favor da proliferação, além de vias de sinalização de morte disfuncionais, promovendo a formação de tumores (Fouad & Aanei, 2017; Otto & Sicinski, 2017), que podem ser metastáticos, ou seja, podem apresentar a capacidade de migração.

O EGMO e o EGMQ possuem rica constituição de componentes químicos, apresentando diferentes classes de compostos, bem como de moléculas específicas que são descritas na literatura por apresentarem mecanismos anticâncer. Neste sentido, os efeitos observados neste estudo podem ser decorrentes da ação isolada ou sinérgica de seus constituintes químicos. Adicionalmente, a descoberta dos mecanismos de morte promovidos por estes extratos em células cancerosas é um importante avanço que contribuirá para as perspectivas anticâncer deste produto natural.

5. Conclusões

Em conclusão, este estudo demonstra que os extratos de geoprópolis de *M. orbignyi* e *M. q. anthidioides* reduzem seletivamente a viabilidade celular de diferentes linhagens cancerígenas, diminuem a migração de células de melanoma altamente metastáticas e promovem a morte de células de melanoma murino e de leucemia humana, ativando caspases para promoção de apoptose e ativando RIPK-1 para promoção de necroptose. Este trabalho abre novas perspectivas em relação ao potencial anticâncer dos extratos de geoprópolis de *M. orbignyi* e *M. q. anthidioides*.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelos órgãos de fomento Fundação de Apoio para o Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia da Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Aiello, N. M., Maddipati, R., Norgard, R. J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Stanger, B. Z. EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration. *Developmental cell*, v. 45, n. 6, p. 681-695, 2018. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.05.027
- Aktas, H. G., Akgun, T. Naringenin inhibits prostate cancer metastasis by blocking voltage-gated sodium channels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 770-775, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.008
- Anderson, R. L.; Balasas, T.; Callaghan, J; Coombes, R. C.; Evans, J.; Hall, J. A.; Kinrade, K.; Jones, D.; Jones, P. S.; Jones, R.; Marshall, J. F.; Panico, M. B.; Shaw, J. A.; Steeg, P. S.; Sullivan, M.; Tang, W.; Westwell, A. D.; Ritchie, J. W. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 16, n. 3, p. 185-204, 2019. DOI: 10.1038/s41571-018-0134-8.
- Araújo, M. J. A. M., Bosco, S. D. M. G., Sforcin, J. M. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *brazilian journal of microbiology*, v. 47, p. 863-869, 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.06.008.
- Balaha, H. M., Hassan, A. E. S. Skin cancer diagnosis based on deep transfer learning and sparrow search algorithm. *Neural Computing and Applications*, v. 35, n. 1, p. 815-853, 2023. DOI: 10.1007/s00521-022-07762-9.
- Barboza, J. R., Pereira, F. A. N., Fernandes, R. A., Vasconcelos, C. C., Cartágenes, M. D. S. D. S., Oliveira Lopes, A. J., Melo, A. C., Guimarães, I. S., Rocha, C. Q., Ribeiro, M. N. D. S. Cytotoxicity and Pro-Apoptotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Geopropolis Produced by the Stingless Bee *Melipona fasciculata* Smith. *Biology*, v. 9, n. 9, p. 292, 2020. DOI: 10.3390/biology9090292
- Bartolomeu, A. R., Frión-Herrera, Y., Da Silva, L. M., Romagnoli, G. G., De Oliveira, D. E., Sforcin, J. M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 81, p. 48-55, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.03.049.
- Basu, S.; Cheriyaundath, S.; Bem-Ze'Ev, A. Cell-cell adhesion: linking Wnt/ β -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. *F1000Research*, v. 7, 2018. DOI: 10.12688/f1000research.15782.1.
- Boogaard, V.D., W. M. C., Komninos, D. S. J., Vermeij, W. P. Chemotherapy side-effects: not all DNA damage is equal. *Cancers*, v. 14, n. 3, p. 627, 2022. DOI: 10.3390/cancers14030627.
- Campos, J. F.; dos Santos, U. P.; Macorini, L. F. B.; de Melo, A. M. M. F.; Balestieri, J. B. P.; Paredes-Gamero, E. J.; Cardoso, C. A. L.; Souza, K.P; Santos, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*, v. 65, p. 374-380, 2014. DOI: 10.1016/j.fct.2014.01.008.
- Cassano, R., Cuconato, M., Calviello, G., Serini, S., Trombino, S. Recent advances in nanotechnology for the treatment of melanoma. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 785, 2021. DOI: 10.3390/molecules26040785.
- Catanzaro, E., Turrini, E., Kerre, T., Sioen, S., Baeyens, A., Guerrini, A., Fimognari, C. Perillaldehyde is a new ferroptosis inducer with a relevant clinical potential for acute myeloid leukemia therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 154, p. 113662, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113662.

- Chahar, M. K., Sharma, N., Dobhal, M. P., Joshi, Y. C. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy reviews*, v. 5, n. 9, p. 1, 2011. DOI: 10.4103/0973-7847.79093.
- Chandra, J., Hasan, N., Nasir, N., Wahab, S., Thanikachalama, P. V., Sahebkar, A., Kesharwani, P. Nanotechnology-empowered strategies in treatment of skin cancer. *Environmental Research*, v. 235, p. 116649, 2023. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116649.
- Chen, J., Kos, R., Garssen, J., Redegeld, F. Molecular insights into the mechanism of necroptosis: the necrosome as a potential therapeutic target. *Cells*, v. 8, n. 12, p. 1486, 2019. DOI: 10.3390/cells8121486.
- Chiang, E. P. I., Tsai, S. Y., Kuo, Y. H., Pai, M. H., Chiu, H. L., Rodriguez, R. L., Tang, F. Y. Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *PloS one*, v. 9, n. 6, p. e99631, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0099631.
- Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R. O., Araújo, M. J. A. M., Búfalo, M. C., Sforcin, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, v. 2013, p.1-6, 2013. DOI: 10.1155/2013/737386.
- Coelho, G. R., Mendonça, R. Z., Vilar, K. D. S., Figueiredo, C. A., Badari, J. C., Taniwaki, N., Negri, G. Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *Scaptotrigona postica* against antiherpes simplex virus (HSV-1). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/296086.
- Coutinho S., Matos V., Seixas N, Rodrigues H., Paula VB., Freitas L., Dias T., Santos FAR., Dias LG., Estevinho LM. *Melipona scutellaris* Geopropolis: Chemical Composition and Bioactivity. *Microorganisms*, v. 11, n. 11, p. 2779, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11112779.
- Cunha, M. G.; Franchin, M.; Galvão, L.; De Ruiz, A.; De Carvalho, J. E.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2013. DOI: 10.1186/1472-6882-13-23.
- Cunha, M. G., Rosalen, P. L., Franchin, M., de Alencar, S. M., Ikegaki, M., Ransom, T., Beutler, J. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. *Planta medica*, v. 82, n. 03, p. 190-194, 2016. DOI: 10.1055/s-0035-1558142.
- Duan, J., Guo, H., Fang, Y., Zhou, G. The mechanisms of wine phenolic compounds for preclinical anticancer therapeutics. *Food & Nutrition Research*, v. 65, 2021. DOI: 10.29219/fnr.v65.6507.
- Dutra, R. P., Bezerra, J. L., Silva, M. C. P. D., Batista, M. C. A., Patrício, F. J. B., Nascimento, F. R. F., Guerra, R. N. M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 29, p. 287-293, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjbp.2019.02.009>.
- Elghondakly, M., Moawad, A., Hetta, M. Cytotoxicity and chromatographic analysis of *Dioon spinulosum*, family Zamiaceae. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 10, n. 12, p. 075-082, 2020. DOI:10.7324/JAPS.2020.101210.

- Faramarzi, F., Alimohammadi, M., Rahimi, A., Alizadeh-Navaei, R., Shakib, R. J., Rafiei, A. Naringenin induces intrinsic and extrinsic apoptotic signaling pathways in cancer cells: A systematic review and meta-analysis of in vitro and in vivo data. *Nutrition Research*, v. 105, p. 33-52, 2022. DOI: 10.1016/j.nutres.2022.05.003.
- Ferreira, B. L., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Micke, G. A., Maltez, H. F., Ressureição, C., Fett, R. Southern-Brazilian geopropolis: A potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. *Food Research International*, v. 126, p. 108683, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108683.
- Ferreira, R. C., De Souza Dias, F., De Aragão Tannus, C., Santana, F. B., Dos Santos, D. C. M. B., De Souza Dias, F., Castro, M. S., Brandão, H. N., Junior Santos, A. F., Silva, L. C. R. C., Chinalia, F. A. Essential and potentially toxic elements from Brazilian geopropolis produced by the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* using ICP OES. *Biological Trace Element Research*, v. 199, n. 9, p. 3527-3539, 2020. DOI: 10.1007/s12011-020-02455-7.
- Fouad, Y. A., Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017. PMID: 28560055.
- Global Cancer Observatory. Cancer Today. 2022a. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/tables?mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=0> Acessado em: abril de 2024.
- Global Cancer Observatory. Cancer Today. 2022b. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/tables?mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=0&types=1> Acessado em: abril de 2024.
- Global Cancer Observatory. Cancer Tomorrow. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2040&types=1&single_unit=500000, acesso em: 22 de abril de 2024.
- Guo, X., Gao, C., Yang, D. H., Li, S. Exosomal circular RNAs: a chief culprit in chemotherapy resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*, p. 100937, 2023. DOI: 10.1016/j.drug.2023.100937.
- Hao, T., Li-Talley, M., Buck, A., Chen, W. An emerging trend of rapid increase of leukemia but not all cancers in the aging population in the United States. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 12070, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-48445-1.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Zhang, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2009. DOI: 10.1080/01635580903191585.
- Jeon, S. H., Chun, W., Choi, Y. J., Kwon, Y. S. Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. *Archives of pharmacal research*, v. 31, p. 978-982, 2008. DOI: 10.1007/s12272-001-1255-9.
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., Yang, L. V. In vitro cell migration and invasion assays. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 88, p. e51046, 2014. DOI: 10.3791/51046.
- Juszczak, A. M., Wöelfle, U., Končić, M. Z., Tomczyk, M. Skin cancer, including related pathways and therapy and the role of luteolin derivatives as potential therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, v. 42, n. 4, p. 1423-1462, 2022. DOI: 10.1002/med.21880.

Khalid, N.; Azimpouran, M. “Necrosis”, *StatPearls*, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>. Acesso em: abril de 2021.

Kroschinsky, F., Stölzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., Intensive Care in Hematological and Oncological Patients (iCHOP) Collaborative Group. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Critical Care*, v. 21, p. 1-11, 2017. DOI: 10.1186/s13054-017-1678-1.

Kuryk, L., Bertinato, L., Staniszewska, M., Pancer, K., Wieczorek, M., Salmaso, S., Caliceti, P., Garofalo, M. From conventional therapies to immunotherapy: melanoma treatment in review. *Cancers*, v. 12, n. 10, p. 3057, 2020. DOI: 10.3390/cancers12103057.

Li, Y., Egranov, S. D., Yang, L., Lin, C. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs-mediated cancer metastasis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, v58, n. 4, p. 200-207, 2019. DOI: 10.1002/gcc.22691.

Long, N. A., Golla, U., Sharma, A., Claxton, D. F. Acute myeloid leukemia stem cells: Origin, characteristics, and clinical implications. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 18, n. 4, p. 1211-1226, 2022. DOI: 10.1007/s12015-021-10308-6.

Ma, T., Zhang, J. Upregulation of FOXP4 in breast cancer promotes migration and invasion through facilitating EMT. *Cancer management and research*, v. 11, p. 2783-2793, 2019. DOI: 10.2147/CMAR.S191641.

Maher, T., Ahmad Raus, R., Daddiouaissa, D., Ahmad, F., Adzhar, N. S., Latif, E. S., Mohammed, A. Medicinal plants with anti-leukemic effects: A review. *Molecules*, v. 26, n. 9, p. 2741, 2021. DOI: 10.3390/molecules26092741.

Marie, K. L., Sassano, A., Yang, H. H., Michalowski, A. M., Michael, H. T., Guo, T., Mishra, P. J. Melanoblast transcriptome analysis reveals pathways promoting melanoma metastasis. *Nature communications*, v.11, n. 1, p. 333, 2020. DOI: 10.1038/s41467-019-14085-2.

Mittal, V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 13, p. 395-412, 2018. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.

Motallebi, M., Bhia, M., Rajani, H. F., Bhia, I., Tabarraei, H., Mohammadkhani, N., Shakibaei, M. Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy. *Life Sciences*, p.120752, 2022. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120752

National Cancer Institute. What is cancer? Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>> acessado em: agosto de 2024.

Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

Nobili, S., Lapucci, A., Landini, I., Coronnello, M., Roviello, G., Mini, E. Role of ATP-binding cassette transporters in cancer initiation and progression. In: *Seminars in cancer biology. Academic Press*, p. 72-95, 2020. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.006

Nogueira-Neto, P. “Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão”. 1. ed. *São Paulo: Edição Nogueirapis*, p. 446 ,1997. ISBN-86525.

Oliveira, L. P. G., Conte, F. L., de Oliveira Cardoso, E., Conti, B. J., Santiago, K. B., de Assis Golim, M., Sforzin, J. M. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously

with geopropolis favoring monocyte functions. *Life sciences*, v. 217, 81-90, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.11.060.

Organização Mundial da Saúde. Câncer. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1> acessado em: 21 de abril de 2024.

Otto, T., Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 2, p. 93-115, 2017. DOI: 10.1038/nrc.2016.138.

Perez, G. I., Bernard, M. P., Vocelle, D., Zarea, A. A., Saleh, N. A., Gagea, M. A., Kanada, M. Phosphatidylserine-Exposing Annexin A1-Positive Extracellular Vesicles: Potential Cancer Biomarkers. *Vaccines*, v. 11, n. 3, p. 639, 2023. DOI: 10.3390/vaccines11030639.

Pérez-González, A., Bévant, K., Blanpain, C. Cancer cell plasticity during tumor progression, metastasis and response to therapy. *Nature cancer*, v. 4, n. 8, p. 1063-1082, 2023. DOI: 10.1038/s43018-023-00595-y.

Ratley, A., Minj, J., Patre, P. Leukemia disease detection and classification using machine learning approaches: a review. In: 2020 First International Conference on Power, Control and Computing Technologies (ICPC2T). IEEE, p. 161-165, 2020. DOI: 10.1109/ICPC2T48082.2020.9071471.

Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., Alnemri, E. S. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications*, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2017. DOI: 10.1038/ncomms14128.

Rubinho, M. P., de Carvalho, P. L. N., Reis, A. L. L. E., Ern, Reis, E., de Alencar, S. M., Ikegaki, M. A comprehensive characterization of polyphenols by LC-ESI-QTOF-MS from *Melipona quadrifasciata anthidioides* geopropolis and their antibacterial, antioxidant and antiproliferative effects. *Natural product research*, v. 34, n. 21, p. 3139-3144, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1607851.

Sachet, M., Liang, Y. Y., Oehler, R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, v. 22, n. 10, p. 1189-1204, 2017. DOI: 10.1007/s10495-017-1413-z.

Saleem, A., Akhtar, M. F., Sharif, A., Akhtar, B., Siddique, R., Ashraf, G. M., Alharthy, S. A. Anticancer, cardio-protective and anti-inflammatory potential of natural-sources-derived phenolic acids. *Molecules*, v. 27, n. 21, p. 7286, 2022. DOI: 10.3390/molecules27217286.

Santos, H. F., Campos, J. F., Santos, C. M., Balestieri, J. B. P., Silva, D. B., Carollo, C. A., De Picoli Souza, K., Estevinho, L. M., Dos Santos, E. L. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 5, p. 953, 2017a. DOI: 10.3390/ijms18050953.

Santos, C. M., Campos, J. F., Santos, H. F., Balestieri, J. B. P., Silva, D. B., De Picoli Souza, K., Carollo, C. A., Estevinho, L. M., Dos Santos, E. L. Chemical composition and pharmacological effects of geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2017, 2017b. DOI: 10.1155/2017/8320804.

Silva, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS letters*, v. 584, n. 22, p. 4491-4499, 2010. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.046.

Silva, P.G.d.; Chaves, E.J.F.; Silva, T.M.S.; Rocha, G.B.; Dantas, W.M.; Oliveira, R.N.d.; Pena, L.J. Antiviral activity of flavonoids from Geopropolis of the Brazilian Jandaira bee against zika and dengue viruses. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 10, p. 2494, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102494>

Siqueira, J. S., Mescouto, C. S. T., Lemos, M. D. S., Junior, J. B. P., Venturieri, G. C., Filho, H. A. D., Dantas, K. D. G. F. Determination of inorganic elements in geopropolis samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of Apicultural Research*, p. 1-8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1745435>.

Sousa-Fontoura, D. M., Olinda, R. G., Viana, G. A., De Fm Costa, K. M., Batista, J. S., Serrano, R. M., Silva, O. M. O. D., Camara, C. A., Silva, T. M. Wound healing activity and chemical composition of geopropolis from *Melipona subnitida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 30, p. 367-373, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00030-8>.

Stabrauskiene, J., Kopustinskiene, D. M., Lazauskas, R., & Bernatoniene, J. Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities. *Biomedicines*, v. 10, n. 7, p. 1686, 2022

Suhaili, S. H., Karimian, H., Stellato, M., Lee, T. H., Aguilar, M. I. Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization. *Biophysical reviews*, v. 9, n. 4, p. 443-457, 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0308-0.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v.71, n. 3, p. 209-249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

Tomko, A. M., Whynot, E. G., Ellis, L. D., Dupré, D. J. Anti-cancer potential of cannabinoids, terpenes, and flavonoids present in cannabis. *Cancers*, v. 12, n. 7, p. 1985, 2020. DOI: 10.3390/cancers12071985.

Wesołowska, O., Wiśniewski, J., Środa-Pomianek, K., Bielawska-Pohl, A., Paprocka, M., Duś, D., Michalak, K. Multidrug resistance reversal and apoptosis induction in human colon cancer cells by some flavonoids present in citrus plants. *Journal of natural products*, v. 75, n. 11, p. 1896-1902, 2012. DOI: 10.1021/np3003468.

Wróblewska-Łuczka, P., Cabaj, J., Bargieł, J., Łuszczki, J. J. Anticancer effect of terpenes: focus on malignant melanoma. *Pharmacological Reports*, p. 1-11, 2023. DOI: 10.1007/s43440-023-00512-1.

Zajączkowska, R., Kocot-Kępska, M., Leppert, W., Wrzosek, A., Mika, J., Wordliczek, J. Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 6, p. 1451, 2019. DOI: 10.3390/ijms20061451.

Zeng, L., Gowda, B. J., Ahmed, M. G., Abourehab, M. A., Chen, Z. S., Zhang, C., Kesharwani, P. Advancements in nanoparticle-based treatment approaches for skin cancer therapy. *Molecular Cancer*, v. 22, n. 1, p. 10, 2023. DOI: 10.1186/s12943-022-01708-4.

Zhang, H.; Liu, L.; Wang, Y.; Zhao, G.; Xie, R.; Liu, C.; Xiao, X.; Wu, K.; Nie, Y.; Zhang, H.; Fan, D. KLF8 involves in TGF-beta-induced EMT and promotes invasion and migration in

gastric cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 139, n. 6, p. 1033-1042, 2013. DOI: 10.1007/s00432-012-1363-3.

Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., Han, J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell research*, v. 28, n. 1, p. 9-21, 2018. DOI: 10.1038/cr.2017.133.

Zhao, L., Yu, M., Sun, M., Xue, X., Wang, T., Cao, W., Sun, L. Rapid determination of major compounds in the ethanol extract of geopropolis from Malaysian stingless bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. *Molecules*, v. 22, n. 11, p. 1935, 2017. DOI: 10.3390/molecules22111935.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que os extratos de geoprópolis produzidas por *Melipona orbignyi* (EGMO) e *Melipona quadrifasciata anthidioides* (EGMQ) promovem proteção de proteínas e DNA contra danos oxidativos, não induzem toxicidade em *C. elegans* e promovem a proteção contra danos promovidos pelo estresse oxidativo e térmico e ainda aumentam sua expectativa de vida. Adicionalmente, os extratos de geoprópolis de *M. orbignyi* e *M.q. anthidioides* reduzem seletivamente a viabilidade de diferentes linhagens cancerígenas. Além da redução da viabilidade, as linhagens de células de melanoma tiveram sua migração celular potentemente inibida. Além disso, os mecanismos de citotoxicidade em células de melanoma murino e de leucemia foram predominantemente apoptose dependente de caspases, sendo evidenciado também o envolvimento de necroptose na morte induzida pelos extratos em células B16F10-Nex2 e Jurkat. Neste contexto, este estudo demonstra que a geoprópolis de ambas as espécies de abelhas nativas sem ferrão apresentam potencial terapêutico para desenvolvimento de produtos biotecnológicos voltados para a prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e câncer.