



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

MIRIAN CAROLINI ESGOTI AAL

ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GEOPRÓPOLIS EM
ASSOCIAÇÃO À CARBOPLATINA EM CÉLULAS
TUMORAIS OVARIANAS

BOTUCATU – SP
2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MIRIAN CAROLINI ESGOTI AAL

ATIVIDADE ANTITUMORAL DA GEOPRÓPOLIS EM ASSOCIAÇÃO À CARBOPLATINA EM CÉLULAS TUMORAIS OVARIANAS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo Almeida
Chuffa
Coorientador: Prof. Dr. José Maurício Sforcin

A112a

Aal, Mirian Carolini Esgoti

Atividade antitumoral da geoprópolis em associação à carboplatina
em células tumorais ovarianas / Mirian Carolini Esgoti Aal. --
Botucatu, 2025

67 p. : il., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Flávia Karina Delella

Coorientador: Luiz Gustavo de Almeida Chuffa

Coorientador: José Mauricio Sforcin

1. Câncer. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Geoprópolis. 4. Ovários -
Tumores. 5. Câncer - Tratamento. I. Título.



Impacto Potencial desta pesquisa

1. Título da Tese: Atividade Antitumoral da Geoprópolis em Associação à Carboplatina em Células Tumerais Ovarianas

A presente pesquisa tem potencial para gerar impactos sociais significativos especialmente no contexto da saúde pública. Além disso, está alinhada com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis da Agenda de 2030 da ONU, especialmente com o ODS 3 – saúde e bem-estar, tendo em vista a busca por novas alternativas terapêuticas para o câncer de ovário, uma doença com alta mortalidade entre as mulheres. A investigação da geoprópolis, um produto natural brasileiro, em combinação com o quimioterápico carboplatina, visa desenvolver estratégias de tratamento mais eficazes, seguras e acessíveis, contribuindo para a ampliação do acesso à saúde e a melhoria da qualidade de vida das pacientes oncológicas. Além disso, por valorizar a biodiversidade brasileira, e fomentar a aplicação no desenvolvimento de terapias inovadoras, dialoga com as ODS 9 – Indústria, inovação e infraestrutura em termos de utilizar a pesquisa translacional e fortalecer a ciência nacional; e ODS 15 – Vida terrestre promovendo o uso consciente da biodiversidade atrelada a produção do produto natural aqui aplicado.

Potential impact of this research

1. Thesis Title: Antitumor Activity of Geopropolis in Association with Carboplatin in Ovarian Tumor Cells

This research has the potential to generate significant social impacts, particularly in the context of public health. Furthermore, it aligns with the United Nations 2030 Agenda for Sustainable Development Goals (SDGs), especially SDG 3 – Good Health and Well-being, given its focus on exploring new therapeutic alternatives for ovarian cancer, a disease with high mortality among women. The investigation of geopropolis, a natural Brazilian product, in combination with the chemotherapeutic agent carboplatin, aims to develop more effective, safer, and accessible treatment strategies. This contributes to expanding access to healthcare and improving the quality of life for cancer patients. Additionally, by valuing Brazilian biodiversity and promoting its application in the development of innovative therapies, the project also aligns with SDG 9 – Industry, Innovation and Infrastructure, by advancing translational research and strengthening national science; and SDG 15 – Life on Land, by promoting the conscious use of biodiversity associated with the production of the natural compound under study.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Atividade Antitumoral da Geoprópolis em Associação à Carboplatina em Células Tumerais Ovarianas

AUTORA: MIRIAN CAROLINI ESGOTI AAL

ORIENTADORA: FLAVIA KARINA DELELLA

COORIENTADOR: LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA

COORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO SFORCIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia Celular Estrutural e Funcional pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA KARINA DELELLA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Dr. FERNANDO GUIMARÃES (Participação Virtual)
Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher Prof. Dr. José Aristotemo Pinotti / Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

Dra. ARIANA MUSA DE AQUINO (Participação Virtual)
Departamento de Pesquisa em Câncer Pancreático / Hospital Henry Ford

Profa. Dra. ESTELA DE OLIVEIRA LIMA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. MARCIA GUIMARÃES DA SILVA (Participação Presencial)
Deppto. de Patologia / FM/Botucatu - Unesp

Botucatu, 01 de agosto de 2025

Documento assinado digitalmente
 **OLGA MARIA RAUER DEMANT**
Data: 08/08/2025 10:38:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Olga Maria Rauer Demant
Supervisora da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por estar sempre presente compartilhando tanto os momentos de alegria quanto de luta. À minha mãe Marlene Esgoti, por ensinar e me fazer acreditar que a educação é o caminho. À minha irmã Raquel, por me ouvir falar tantas vezes sobre meus projetos que aprendeu um pouco apesar de viver outra realidade completamente diferente.

Aos meus amigos que sempre deram força e puxões de orelha quando foi preciso – Beatriz, Isabelle, Laura, Caxali e especialmente Tainá, quem dividiu horas comigo revisando e discutindo projetos, além de bons momentos fora da vida científica.

Aos que dividiram a vida comigo durante um ano e tornaram minha estadia mais especial, entre os momentos de muito trabalho – Manolo, Alan, Mihai, Rafaela, Qui, Ananya, Huynh, Yan, Daheui, Kianna, Diana, Gaby e Andrés. Obrigada por serem meu lar enquanto eu estava tão longe do meu.

Aos que vieram e se foram nessa jornada, obrigada por deixarem sua marca, espero ter deixado a minha também.

À minha orientadora Flávia Delella, quem desde sempre tem sido presente, me mostrando o caminho das pedras. Mais que uma orientadora, eu vejo em você um exemplo que tem moldado minha visão como pesquisadora e mulher. Espero levar essa parceria para a vida.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, ao qual orgulhosamente fiz parte e tornou esse sonho possível. Espero retribuir o conhecimento que aqui me foi compartilhado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro durante todo período do Doutorado, bem como ao Programa de Internacionalização da CAPES pela enriquecedora experiência de pesquisa internacional e por propiciar mostrar a outro país a qualidade da ciência feita no Brasil.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam
um pouco de si, levam um pouco de nós”*

Antoine de Saint-Exupéry



RESUMO

O câncer de ovário (CO) é a doença ginecológica que causa maior número de óbitos entre as mulheres em todo o mundo e, devido a sua sintomatologia inespecífica nos estágios iniciais, tende a ser negligenciado ou ainda confundido com outras doenças. Atualmente, o tratamento consiste em cirurgia citorrredutora e quimioterapia com medicamentos da classe da platina e dos taxanos, de acordo com o estadiamento do tumor. Embora esta abordagem tenha sido eficiente na terapia primária, a doença se repete em cerca de 70% dos casos, levando à resistência aos quimioterápicos e alta taxa de mortalidade. Tem sido relatado na literatura que a associação entre compostos naturais e quimioterápicos pode ser benéfica para a otimização do tratamento, podendo diminuir ou ainda evitar a quimiorresistência. Nesta perspectiva, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atuação da geoprópolis (Geo) isolada ou combinada ao quimioterápico carboplatina (CB) em células tumorais ovarianas. Para isso, células tumorais ovarianas das linhagens SKOV3, OVCAR3 e OVCAR8 foram cultivadas em cultura celular bidimensional e tridimensional, expostas aos compostos Geo e CB, seguido de análises de marcação de fluorescência para avaliação da morfologia, proliferação, viabilidade celular e apoptose, além de ensaios de migração. Os resultados demonstraram que a geoprópolis apresenta efeito citotóxico seletivo em células tumorais de ovário, acentuando o impacto da carboplatina quando em combinação. Além da redução da viabilidade celular, a associação dos compostos promoveu prejuízo à migração e adesão celular, sugerindo potencial contenção de mecanismos relacionados à progressão e disseminação tumoral. A baixa ativação de caspases, combinada à persistência de marcadores proliferativos e expressão intermediária de Rad51, pode indicar o envolvimento de vias de morte alternativas. O estudo amplia o conhecimento sobre o potencial terapêutico da geoprópolis como agente adjuvante no tratamento do câncer de ovário, embora ressalte-se a necessidade de análises moleculares complementares para elucidar os mecanismos subjacentes envolvidos na morte celular não apoptótica e migração.

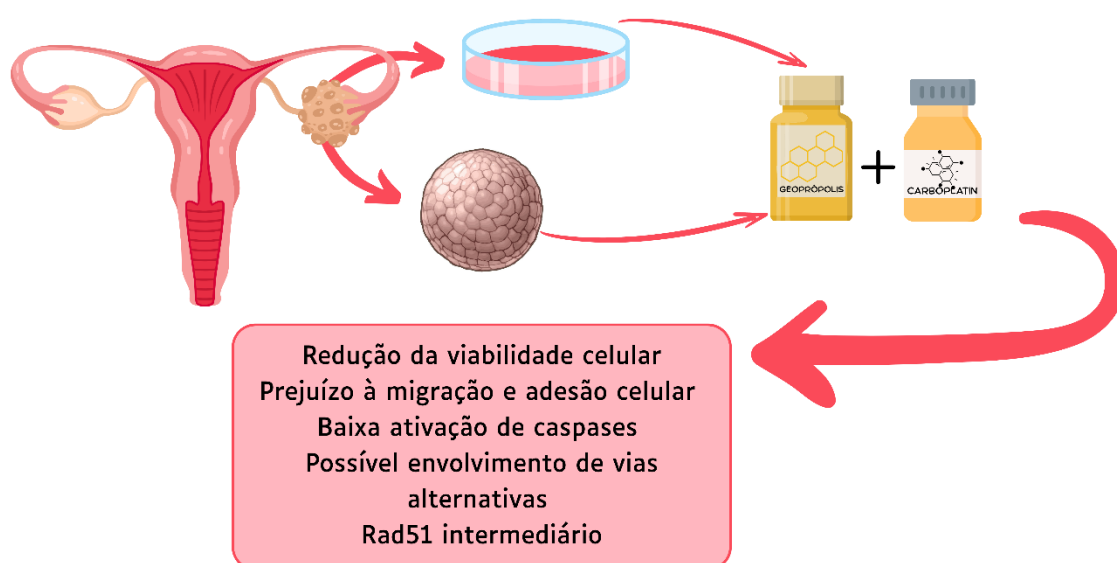
Palavras-chave: cultura celular tridimensional, câncer de ovário, microambiente tumoral, carboplatina, própolis.



ABSTRACT

Ovarian cancer (OC) is the gynecological disease responsible for the highest number of deaths among women worldwide. Due to its nonspecific symptomatology in the early stages, it is often overlooked or misdiagnosed as another condition. Currently, treatment consists of cytoreductive surgery followed by chemotherapy with platinum- and taxane-based drugs, depending on the tumor stage. Although this approach has proven effective in primary therapy, the disease recurs in approximately 70% of cases, leading to chemoresistance and high mortality rates. The literature has reported that combining natural compounds with chemotherapeutic agents may enhance treatment efficacy and potentially reduce or prevent the development of chemoresistance. From this perspective, the aim of the present study was to evaluate the effects of geopropolis (Geo), either alone or in combination with the chemotherapeutic agent carboplatin (CB), on ovarian tumor cells. To this end, ovarian cancer cell lines SKOV3, OVCAR3, and OVCAR8 were cultured in two-dimensional and three-dimensional systems and exposed to Geo and CB. Subsequently, fluorescence labeling was performed to assess morphology, proliferation, cell viability, and apoptosis, as well as cell migration assays. The results showed that geopropolis exhibits selective cytotoxic effects on ovarian cancer cells and enhances the action of carboplatin when used in combination. In addition to reducing cell viability, the combination of the compounds impaired cell adhesion and migration, suggesting a potential suppression of mechanisms involved in tumor progression and dissemination. Low caspase activation, along with sustained expression of proliferation markers and intermediate levels of Rad51, may indicate the involvement of alternative cell death pathways. This study expands the current knowledge on the therapeutic potential of geopropolis as an adjuvant agent in the treatment of ovarian cancer, although further molecular analyses are needed to clarify the underlying mechanisms involved in non-apoptotic cell death and migration.

Key words: three-dimensional cell culture; ovarian cancer; tumor microenvironment; carboplatin; propolis.



Resumo Gráfico



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Condições de cultivo e parâmetros experimentais utilizados para as linhagens HFF-1, SKOV-3, OVCAR-3 e OVCAR-8, incluindo o tipo de modelo (2D ou 3D), meio de cultura, suplementação e concentrações de carboplatina e geoprópolis aplicadas.....35

Figura 2: Representação esquemática dos ensaios realizados nas linhagens OVCAR-3, OVCAR-8 e SKOV-3, cultivadas em modelos bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D), submetidas aos tratamentos com carboplatina, geoprópolis ou à associação de ambos. Foram avaliados os parâmetros de viabilidade celular (MTT, Calceína/Iodeto de propídio), apoptose (Caspase-3/-7), migração (esferoides e *wound healing*) e expressão de marcadores proliferação e reparo por imunofluorescência (KI-67, faloidina, Rad51, ZO-1).....38

Figura 3: Análise de viabilidade das células HFF-1 expostas à geoprópolis. Control (meio de crescimento), CTE (meio de crescimento adicionado do veículo EtOH 70%), 25, 50, 75 e 100µg/mL (meio de crescimento suplementado com geoprópolis nas respectivas concentrações). A) 24 horas. B) 48 horas. C) 72 horas.....39

Figura 4: Padronização dos esferóides de células SKOV-3 a partir das concentrações de $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $1,5 \times 10^4$ e 2×10^4 células/poço, cultivadas por 24, 48 e 72 horas.....40

Figura 5: Análise de viabilidade dos esferóides de câncer de ovário. **A)** Skov-3: Carbo 42.5µM, Geo 127.5µg; **B)** OvcAR-3: Carbo 127.5µM, Geo 85µg; **C)** OvcAR-8: Carbo 25µM, Geo 340µg. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.....41

Figura 6: Análise de Sinergismo entre carboplatina e geoprópolis nas linhagens de câncer de ovário SKOV-3 e OvcAR-3 utilizando o modelo ZIP. **A)** Mapas de sinergismo (superfície 3D) demonstrando as regiões de interação com base nos escores ZIP. Áreas em vermelho indicam interação positiva (sinergismo), enquanto áreas em verde representam interação negativa (antagonismo). Os escores ZIP obtidos foram -0,923 para SKOV-3 e 2,577 para OVCAR-3, valores que indicam interação aditiva conforme os critérios da plataforma. **B)** Matrizes de resposta à dose expressas em porcentagem de inibição da viabilidade celular. A intensidade da cor vermelha reflete maior inibição da viabilidade, e os valores numéricos correspondem à



média percentual de inibição para cada combinação de doses. *SynergyFinder* v2.0 (<https://synergyfinder.fimm.fi>).....42

Figura 7: Análise da viabilidade de esferóides OVCAR-8 GFP tratados com carboplatina (25 μ M) e geoprópolis (340 μ g). Imagens de fluorescência obtidas no dia 5 após coloração com Calceína AM e Iodeto de propídio, onde células viáveis aparecem em verde (Calceína AM) e células mortas em vermelho (Iodeto de propídio).....44

Figura 8: Detecção de apoptose em esferóides da linhagem OVCAR-8 tratados com carboplatina (25 μ M), geoprópolis (340 μ g/mL) ou sua combinação. A fluorescência verde indica a ativação de caspases-3/7.....45

Figura 9: Análise da migração celular pelo ensaio de cicatrização em células de câncer de ovário - SKOV-3 tratadas com carboplatina (85 μ M), geoprópolis (85 μ g) ou a combinação de ambos por 48 horas. (A-) Imagens representativas da área da ferida nas condições: controle, Carbo, Geo e Carbo+Geo nos tempos 0, 24 e 48h. (B)- Quantificação da área de fechamento da ferida em 24h e 48h (% de *wound coverage*). (C)- Análise estatística da porcentagem de cobertura da ferida após 48h de tratamento. Os dados estão expressos como média $\pm$ DP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$46

Figura 10: Análise da migração de esferóides de células SKOV-3. Esferóides formados e estabilizados por seis dias plaqueados em placas de 6 poços. **A)** Adesão e crescimento dos esferóides após tratamento. **B)** Área de crescimento ao longo de 72 horas. **C)** Área de migração após 72h.....47

Figura 11: Análise por imunofluorescência de esferóides de OVCAR-8 tratados com carboplatina (25 μ M), geoprópolis (340 μ g) ou combinação por 5 dias. **A)** marcação para Ki-67 (vermelho), faloidina (roxo), DAPI (azul) e sobreposição (Merged). **B)** Rad51 (roxo), ZO-1 (vermelho), DAPI (azul) e sobreposição (Merged).....48

Figura 12: Esquema apresentando os principais achados científicos deste projeto de pesquisa.....49



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU - 5-fluorouracil

ATCC – *American Type Cell Culture*

AUC – *Area under the curve*

CAPE – *Caffeic Acid Phenethyl Ester*

CB – Carboplatina

CEO – Câncer Epitelial de Ovário

CNM – *Cinnamoiloxi-mameisina*

CO – Câncer de Ovário

DOX – Doxorubicina

EOC – Epithelial Ovarian Cancer

FDA – *Food and Drug Administration*

GEO – Geoprópolis

HGSOC – *High-Grade Serous Ovarian Cancer*

HRR – *Homologous Recombination Repair*

IC25 – *Inhibition concentration of 25%*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MMC – Mitomicina C

MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NER – *Nucleotide Excision Repair*

OC – *Ovarian Cancer*

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis

ONU – Organização das Nações Unidas

PARP – Poli(ADP-ribose) polimerase

PDT – Terapia Fotodinâmica

PFA – Paraformaldeído

PI – Iodeto de Propídio

SFB – Soro Fetal Bovino

spOS-2 – Osteossarcoma canino

TGI – *Total growth inhibition*

TMZ – Temozolomida

ZIP – *Zero Interaction Potency*



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Câncer de ovário: características gerais e microambiente tumoral.....</i>	<i>15</i>
1.2 <i>Carboplatina.....</i>	<i>18</i>
1.3 <i>Geoprópolis.....</i>	<i>19</i>
1.4 <i>Drogas anti-câncer e geoprópolis.....</i>	<i>20</i>
1.5 <i>Geoprópolis e câncer de ovário.....</i>	<i>21</i>
1.6 <i>Cultura celular tridimensional.....</i>	<i>22</i>
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
Capítulo 1 – Atividade Antitumoral da Geoprópolis em Associação à Carboplatina em Células tumorais ovarianas.....	31
1. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	31
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 <i>Objetivos Gerais.....</i>	<i>31</i>
2.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>31</i>
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 <i>Linhagens Celulares.....</i>	<i>32</i>
3.2 <i>Cultura celular tridimensional.....</i>	<i>33</i>
3.2.1 <i>Formação de esferóides tumorais a partir de placas ultra-low attachment.....</i>	<i>33</i>
3.2.2 <i>Formação de esferóides a partir de dispositivos de microfluídica.....</i>	<i>33</i>
3.3 <i>Obtenção da amostra de geoprópolis.....</i>	<i>34</i>
3.4 <i>Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis.....</i>	<i>34</i>
3.5 <i>Exposição das células aos compostos.....</i>	<i>34</i>
3.6 <i>Viabilidade celular através do ensaio MTT.....</i>	<i>35</i>
3.7 <i>Viabilidade através de marcação fluorescente com Calceína AM e Iodeto de Propídio (PI).....</i>	<i>35</i>
3.8 <i>Apoptose em esferóides OVCAR-8 após 5 dias de tratamento.....</i>	<i>36</i>
3.9 <i>Ensaio de Imunofluorescência para análise da proliferação, citoesqueleto, junções celulares e reparo de DNA em esferóides de OVCAR-8.....</i>	<i>36</i>
3.10 <i>Ensaio de Migração Celular Bidimensional – técnica de Wound Healing.....</i>	<i>37</i>
3.11 <i>Ensaio de Migração Celular Tridimensional – A partir dos esferóides.....</i>	<i>37</i>
3.12 <i>Análise de Interação via Synergy Finder.....</i>	<i>37</i>
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS.....	38



5.1	<i>Análise de citotoxicidade da Geoprópolis em células normais</i>	38
5.2	<i>Padronização dos esferóides de células SKOV-3</i>	39
5.3	<i>Citotoxicidade via MTT e via marcação fluorescente (Calceína AM e Iodeto de propídio)</i>	40
5.4	<i>Análise de Interação entre Geoprópolis e Carboplatina por Modelagem ZIP</i>	41
5.5	<i>Viabilidade Celular via marcação fluorescente em esferóides OVCAR-8 após 5 dias de tratamento</i>	43
5.6	<i>Apoptose em esferóides OVCAR-8 após 5 dias de tratamento</i>	44
5.7	<i>Ensaio de migração celular – Wound Healing</i>	45
5.8	<i>Ensaio de migração a partir de esferóides de células SKOV-3</i>	46
5.9	<i>Análise da proliferação, citoesqueleto, junções celulares e reparo de DNA em esferóides de OVCAR-8 tratados com carboplatina e geoprópolis</i>	47
6.	DISCUSSÃO	49
7.	CONCLUSÃO	53
8.	REFERÊNCIAS	54
9.	MATERIAL SUPLEMENTAR	57
9.1	<i>Co-cultura OVCAR-8 e células NK expostas à geoprópolis</i>	57
Capítulo 2 – Treinamento técnico: Fabricação de dispositivos de microfluídica:		
desenvolvimento da técnica e aplicação utilizando células tumorais ovarianas		58
1.	Fabricação dos dispositivos de microfluídica	59
2.	Plaqueamento celular nos dispositivos	64
3.	Referências Bibliográficas	65



1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de ovário: características gerais e microambiente tumoral

O câncer de ovário (CO) é considerado uma das neoplasias malignas mais frequentemente diagnosticadas na ginecologia, sendo mundialmente a quinta doença mais mortal entre as mulheres adultas (Ghoneum et al., 2018; Siegel et al., 2025). No Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), a estimativa de novos casos de CO para o triênio 2023-2025 é de 7310 novos casos, sendo o oitavo câncer mais incidente entre as mulheres no país (INCA, 2023).

Alguns estudos epidemiológicos discutem os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CO, sendo o fator hereditário um dos mais importantes (Cannistra, 2004; La Vecchia, 2017). A nuliparidade também está associada a um risco aumentado de CO, assim como a falta de amamentação. Já o uso de contraceptivos orais, gravidez e lactação estão associados a um risco reduzido (Cannistra, 2004; La Vecchia, 2017). A influência das idades da menarca e da menopausa é pouco discutida na literatura, entretanto a maior incidência da doença parece ocorrer com maior frequência no período pós-menopausa – entre 50 e 74 anos (Yang et al., 2019; Dunneram et al., 2019; Sideris, 2024). Segundo Bray (2024), dos 476.912 casos de câncer de ovário estimados até 2050, 68,31% deverão ocorrer entre a faixa de 55-85+ anos. Yang e colaboradores (2019) desenvolveram um trabalho de meta análise analisando 26 estudos prévios, somando mais de 1 milhão de participantes incluindo mulheres de ancestrias asiáticas, europeias e outras não especificadas, para entender melhor a associação entre idade da primeira menstruação e o desenvolvimento do CO e concluíram que quanto maior a idade da primeira menstruação, menores são os riscos de desenvolvimento do CO.

Os sintomas da doença são considerados inespecíficos e, na maioria das vezes, assintomáticos em estágio inicial. Alguns desses sintomas são: desconforto ou plenitude abdominal, dispepsia, saciedade precoce ou inchaço, como resultado do aumento da pressão abdominal (Cannistra, 2004; Liu et al., 2018). Porém, esses sintomas são propensos a serem identificados e diagnosticados imprecisamente como sinais de outras doenças, causando atrasos na detecção (Gaitskell et al., 2011). Consequentemente, 40% a 50% das pacientes são identificadas apenas quando o CO já se encontra em estágios avançados (Liu et al., 2018), levando a uma baixa taxa de sobrevivência entre as pacientes. Outra razão para este incidente é que, embora muitas pacientes alcancem remissão clínica completa após a terapia primária, a doença se repete em 70% dos casos, desenvolvendo resistência aos medicamentos (Chiou et al., 2003; Heintz et al., 2006; Ottevanger, 2017; Polajžer & Černe, 2025).



A classificação histológica do CO é baseada na morfologia das células tumorais, sendo atribuída de acordo com a semelhança com as células normais que revestem os diferentes órgãos do sistema genital feminino (Scully et al., 1998). Aproximadamente 90-95% dos casos de CO são do tipo epitelial (CEO - câncer epitelial de ovário), enquanto os tipos não epitelial, incluindo câncer de células germinativas e câncer de células estromais, somam aproximadamente 5-10% (Torre et al., 2018). O CEO representa uma neoplasia altamente heterogênea, englobando tumores com distintas histologias, graus de diferenciação e perfis moleculares e microambientais, influenciando diretamente a resposta terapêutica e o prognóstico clínico. Do ponto de vista histopatológico, o CEO é tradicionalmente classificado em cinco subtipos principais: *seroso de alto grau*, *seroso de baixo grau*, *células claras*, *endometrióide* e *mucinoso*. Cada subtipo apresenta características clínicas particulares, incluindo padrões específicos de apresentação, evolução clínica e sensibilidade às terapias disponíveis. Essas variações refletem diferenças biológicas intrínsecas entre os subtipos, com impacto direto nos desfechos clínicos (Lheureux et al., 2019).

Dentre os subtipos de CEO, o câncer de ovário seroso de alto grau (HGSOC - do inglês *High-Grade Serous Ovarian Cancer*) é o mais predominante (Prat, 2012). Alterações deletérias nos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2 e em outros genes envolvidos na reparação de quebras no DNA estão fortemente associadas à predisposição ao subtipo HGSOC (Alsop et al., 2012), sendo responsáveis por 15-20% dos casos. As proteínas BRCA desempenham papel essencial na reparação de danos ao DNA por recombinação homóloga (HRR), atuando junto com a proteína RAD51 na formação de focos nos locais de dano (Orhan et al., 2021). A deficiência em BRCA1/2 ou em outros genes chave desse reparo, como RAD51, leva à deficiência de recombinação homóloga. Em tumores como o HGSC, mutações em TP53 contribuem para a proliferação celular desregulada e instabilidade genômica (Coscia et al., 2016). Na prática clínica, a avaliação dessas alterações baseia-se na detecção de mutações em BRCA e na instabilidade genômica. Ensaio funcionais, como a contagem de focos de RAD51 após dano induzido por radiação e a imuno-histoquímica quantitativa de RAD51 (Orhan et al., 2021), surgem como métodos complementares promissores para aprimorar a predição de sensibilidade ao tratamento quimioterápico.

É importante destacar que o microambiente do CO é bastante complexo, formado por elementos celulares (células epiteliais, fibroblastos, adipócitos, macrófagos, endoteliais, mesoteliais), que se transformam a partir de sinalização parácrina, tornando-se em sua grande maioria células associadas ao câncer, e elementos não celulares (exossomos, proteínas

reguladoras, fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, citocinas, componentes da matriz extracelular) (Figura 1) (Wang et al., 2025). Essa complexa rede de células e moléculas que favorecem a imunossupressão e, simultaneamente, sustentam a sobrevivência, multiplicação e disseminação das células cancerígenas. Elementos não tumorais, como células do sistema imunológico e componentes estromais, desempenham papel central na dinâmica desse microambiente (Wang et al., 2025). Os elementos não celulares são igualmente relevantes e promovem o crescimento e a disseminação de esferóides tumorais na cavidade peritoneal (Worzfeld et al., 2017).

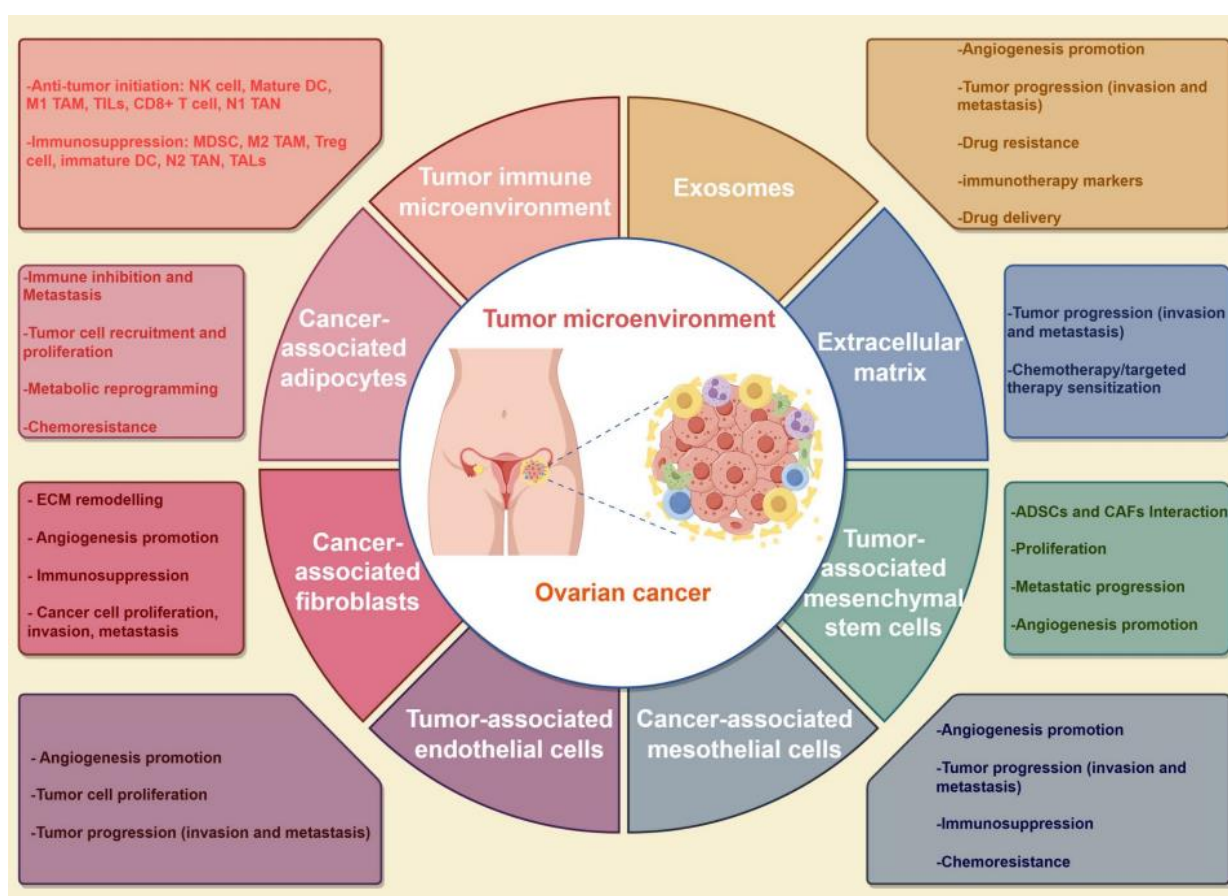


Figura 1: Principais componentes do microambiente tumoral e suas funções no desenvolvimento e progressão do CO (Wang et al., 2025).

O tratamento padrão de primeira linha para o CO geralmente envolve uma cirurgia extensa de citorredução, associada à quimioterapia baseada em platina, podendo ou não incluir o inibidor da angiogênese bevacizumabe (Marchetti et al., 2019). Em determinados casos, esse regime é seguido por uma terapia de manutenção com inibidores da enzima poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) (Moore et al., 2018).



1.2 Carboplatina

A Carboplatina é um quimioterápico frequentemente utilizado no tratamento do CO (Berek et al., 2000; Soares & Silva, 2010; Neves & Vargas, 2011). Também conhecida pelo nome comercial de Paraplatina® (Neves & Vargas, 2011), este fármaco recebeu a aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico em 1985 (Pasetto et al., 2006; Wheate et al., 2010).

Os fármacos a base de platina foram descobertos no final dos anos 60 por Rosenberg e colaboradores (1965), que observaram sua atividade anticancerígena através do crescimento de uma colônia de *Escherichia coli* na presença de um campo elétrico (Rosenberg et al., 1965; Rosenberg et al., 1969), resultando na formação de filamentos de bactérias, sendo esta uma consequência da completa interrupção da divisão celular.

O primeiro fármaco a ser desenvolvido com poder antineoplásico foi a Cisplatina (Alderden et al., 2006), porém, esta apresentava considerável perfil de toxicidade, sendo substituída mais tarde pela Carboplatina (Ho, et al., 2016). Acreditava-se inicialmente que este fármaco tivesse atividade terapêutica "comparável" com a Cisplatina, porém, sua estrutura difere pela presença de ligantes do tipo carboxilato no lugar dos ligantes abandonadores de cloreto. O carboxilato confere maior solubilidade à água, comparado à Cisplatina. A Carboplatina, também é menos reativa, ligando-se em menor extensão às proteínas do plasma, além de ser mais facilmente excretada pela urina. Todos esses fatores reduzem sua toxicidade, o que aumenta sua dose tolerada pelo organismo além de sua eficácia (Wheate et al., 2010; Neves & Vargas, 2011). Diferentemente de outros quimioterápicos, a administração de carboplatina consiste em um cálculo chamado de fórmula de Calvert, o qual é baseado em dados específicos do paciente, tais como idade, peso, função renal – dada pelo nível de creatinina no sangue e AUC (*area under the curve*) recomendada, sendo frequentemente AUC 5-7,5 (du Bois, 2005).

A chave do mecanismo da atividade da Carboplatina está na formação de ligações cruzadas de DNA que interrompem seu funcionamento, culminando subsequentemente em apoptose (Roberts et al., 1986; Lippard, 1987; Cobo et al., 2007; Ho et al., 2016). As principais evidências para esta interação incluem os seguintes argumentos: (a) Indução do crescimento de filamentos em bactérias; (b) Indução de lise em bactérias lisogênicas; (c) Inibição preferencial da síntese de DNA em relação à síntese de RNA e proteínas em culturas de células e (d) Mutagênese (Roberts et al., 1986; Eastman & Barry, 1987; Fontes et al., 1997).



A Carboplatina é capaz de atravessar a membrana celular, onde é hidrolisada e ganha uma carga positiva (Adams et al., 2009; de Sousa et al., 2014), assim, consegue interagir com moléculas nucleofílicas, como DNA ou RNA, por formação de ligação covalente com o local N7 das bases de purina, levando à formação de adutos de platina (McWhinney et al., 2009; Amptoulach & Tsavaris, 2011). Esses adutos podem ser reparados apenas pela via de excisão de nucleotídeos (NER) (Reed, 1998), encaminhando a célula ao processo de apoptose (Ho et al., 2016; Pokhriyal et al., 2019).

O uso de compostos naturais no tratamento de diferentes tipos de câncer, como o CO, tem se mostrado cada vez mais frequente (Justino et al., 2023; Kleczka et al., 2023). Evidências provenientes de estudos e ensaios clínicos indicam que essas substâncias podem contribuir para minimizar os efeitos adversos da quimioterapia, melhorar sua aceitação pelos pacientes e potencializar a eficácia dos tratamentos convencionais por meio de mecanismos complementares (Cheon & Ko, 2020).

1.3 Geoprópolis

Vários estudos sobre o conteúdo e as características biológicas da própolis foram publicados nas últimas décadas, ilustrando o interesse dos pesquisadores por este produto apícola e o seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e aplicações médicas (Sforcin & Bankova, 2011; Sforcin, 2016). A própolis é um produto resinoso que as abelhas elaboram a partir de exsudatos e brotos de plantas, adicionando cera e enzimas (Sforcin & Bankova, 2011). Popularmente é conhecida como "cola de abelha", que é um termo genérico atribuído a este material pegajoso. A palavra "própolis" vem das palavras gregas "pro" para defesa e "polis" para cidade ou comunidade, ou seja, defesa da colméia (Castaldo, 2002).

As abelhas sem ferrão, comumente conhecidas como meliponíneos, são caracterizadas pelo ferrão atrofiado e habitam em colônias (de Camargo, 2017). Essas abelhas geram a geoprópolis (Geo), que é composta de material resinoso obtido de plantas, secreções salivares de abelhas, cera e adicionando, curiosamente, barro ou terra (Nogueira-Neto, 1997). A Geo é conhecida pelo seu uso terapêutico como antisséptico, no tratamento de doenças respiratórias e dermatoses e no fortalecimento das nossas defesas naturais (Bartolomeu et al., 2016).

A ampla aplicação dos produtos derivados de abelhas é atribuída principalmente às diversas atividades biológicas que eles possuem (Hossain et al., 2022), incluindo atividades gastroprotetoras, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antioxidantes, imunomodulatórias, antibióticas e antitumorais (Sforcin, 2007; Araújo et al., 2015; Sforcin, 2016; Pasupuleti, 2017;



Ripari et al., 2021).

Franchin e colaboradores (2016) investigaram a atividade anti-inflamatória da *Cinnamoiloxi-mameisina* (CNM), isolada da Geo em camundongos, verificando que o pré-tratamento com CNM reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e articular dos camundongos, através da inibição da liberação de TNF- α e CXCL2/MIP-2. Além disso em macrófagos, CNM tem influência na fosforilação de ERK 1/2, JNK e p38 MAPK, bem como nos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B.

Vários grupos de pesquisa analisaram a atividade antitumoral da própolis e da Geo. Esses produtos já foram testados em uma variedade de modelos de tumores, incluindo câncer de cabeça e pescoço, pulmão, fígado, pâncreas, rim, próstata, pele, mama, estômago e cólon (Pereira, 2021), com resultados promissores sugerindo que esses compostos naturais podem ser usados como parte de um tratamento médico complementar para tumores humanos (Sforcin & Bankova, 2011; Bartolomeu et al., 2016; Pereira, 2021).

1.4 Drogas anti-cancer e geoprópolis

Partindo da perspectiva farmacodinâmica, o extrato de própolis tem melhorado a atividade anti-câncer através da sensibilização de linhagens quimiorresistentes, além de reduzir a toxicidade por interagir positiva ou sinergicamente com muitos agentes quimioterapêuticos (Hossain et al., 2022).

Embora a composição da própolis possa variar geograficamente (Ristivojević, 2015), tem sido visto na literatura resultados positivos com extratos vindos de diversas regiões geográficas e sob variações nas condições de preparo, em combinação com drogas quimioterápicas como doxorrubicina (DOX), temozolomida (TMZ), 5-fluorouracil (5-FU), mitomicina C (MMC), irinotecano e terapia fotodinâmica (PDT) (Hossain et al, 2022). Sua atuação está relacionada ao aumento da eficácia, diminuição de efeitos colaterais, ou ainda da resistência às drogas (Hossain et al, 2022).

Recentes estudos têm demonstrado que a própolis é capaz de otimizar a ação de agentes antitumorais, hipotetizando um efeito sinérgico. A associação entre propólis e carboplatina atuou inibindo a proliferação de células de osteossarcoma canino (spOS-2) *in vitro* (Bernardino et al., 2018). Além disso, utilizando modelos *in vivo* (fêmeas *Sprague Dawley* com câncer de mama induzido por dimetilbenz(a)antraceno), foi visto que a própolis atuou junto ao quimioterápico paclitaxel, exercendo ação antioxidante e contribuindo para redução dos efeitos colaterais provocados pelo quimioterápico (Padmavathi et al., 2006).



A Geo tem apresentado resultados favoráveis quando combinada a diferentes quimioterápicos. Células HEp-2 (originadas de carcinoma de laringe humana) expostas à combinação de Geo e carboplatina, tiveram redução da viabilidade em resposta a Geo, entretanto a carboplatina não exerceu nenhum efeito, de forma isolada, nessas células, indicando resistência à este fármaco (Araújo et al., 2015).

Em outro estudo utilizando também células HEp-2, Bartolomeu et al. (2016) combinaram Geo com carboplatina, metotrexato e doxorrubicina e obtiveram maior citotoxicidade sobre as células tumorais, comparado aos resultados originados da exposição aos compostos de maneira isolada.

Contíguo a este estudo, o efeito da combinação entre Geo e doxorrubicina foi avaliado em monócitos humanos. Tal combinação não exerceu citotoxicidade para os monócitos, além de proteger o potencial antimicrobiano da doxorrubicina (Oliveira *et al.*, 2019).

1.5 Geoprópolis e câncer de ovário

Considerando a problemática do CO e a busca por novas alternativas terapêuticas, alguns estudos foram direcionados para avaliar a atuação da Geo neste tipo tumoral. Cunha e colaboradores (2013) utilizaram diversas linhagens de diferentes tipos tumorais para avaliar o potencial antiproliferativo da Geo. Entre as linhagens utilizadas, foram avaliadas as linhagens tumorais ovarianas NCI-ADR/RES (*multidrug resistant ovarian*), e OVCAR-03, as quais exibiram resposta antiproliferativa nas concentrações de 23,92 e 11,93 µg/mL respectivamente de Geo. Com base na classificação de TGI (*total growth inhibition*), os autores afirmaram que a Geo apresentou atividade moderada contra as linhagens tumorais ovarianas ($6.25 \mu\text{g/mL} < \text{TGI} < 15 \mu\text{g/mL}$), além de não exibir citotoxicidade contra células não tumorais de fibroblastos murinos (da Cunha, 2013). Esse comportamento indica que a Geo desempenha citotoxicidade seletiva, não sendo prejudicial às células normais.

Em estudos prévios também foi visto que a Geo reduziu a viabilidade de células tumorais ovarianas das linhagens A2780 e ES2 de maneira dose e tempo-dependente, em que concentrações mais elevadas (15.65 e 31.25 µg/mL) e maior tempo de exposição (48h) revelaram resultados mais efetivos. Embora tenha apresentado efeito contra as células tumorais, as células da linhagem não tumoral-HUVEC não foram afetadas pela exposição à Geo (Barboza, 2020). Para explicar como ocorria a citotoxicidade da Geo, os autores analisaram o ciclo celular, verificando que o tratamento aumentou o número de células na fase S, levando ainda ao acúmulo de pequenos fragmentos de DNA em uma sub-fase G1 (considerada como



fase apoptótica) na linhagem A2780. Apesar de os resultados *in vitro* serem considerados preliminares, eles apontam a Geo como um composto promissor para o tratamento antitumoral e com menores efeitos colaterais.

Embora os estudos com a Geo estejam em constante crescimento, pouco se sabe a respeito de sua atuação combinada ao paclitaxel ou à carboplatina no tratamento do CO. Diante deste cenário, fica nítida a relevância da investigação da Geo em combinação ao quimioterápico clássico acima citado e utilizado no tratamento de CO, a fim de estabelecer uma nova estratégia terapêutica na medicina alternativa e complementar para as pacientes oncológicas.

Conforme evidenciado nos exemplos citados, a maioria dos estudos funcionais que investigam os efeitos isolados ou combinados de compostos naturais sobre diferentes tipos de neoplasias tem sido conduzida predominantemente por meio de modelos *in vitro* (Bernardino et al., 2018; Hossain et al., 2022). Nas últimas duas décadas, avanços significativos nas técnicas de cultura celular possibilitaram o desenvolvimento de sistemas que mimetizam, com maior fidelidade, o microambiente tumoral *in vivo*, permitindo análises mais precisas das interações entre células tumorais e o estroma, além de melhor refletirem a complexidade fisiológica dos tecidos. Um exemplo é a técnica de cultura celular tridimensional que tem ganhado força e se consolidado na atualidade, mas tem seu surgimento datado da década de 1970 com esferoides tumorais multicelulares (Friedrich, 2007; Fontana et al., 2020; Caleffi & Aal, 2021).

1.6 Cultura celular tridimensional

O tradicional cultivo celular bi-dimensional (2D) em monocamada é essencial para o descongelamento efetivo, expansão e manutenção das células para pesquisas *in vitro*, porém, várias limitações existem nesse modelo, como por exemplo a perda da arquitetura específica do tecido, da interação célula-célula, alterações na expressão gênica e síntese de proteínas e obtenção de resultados pré-clínicos confiáveis (Figura 2) (Ryan et al., 2016; Souza et al., 2016). Novas técnicas (Figura 3), como os diversos modelos de cultura celular tridimensional (3D) permitem maior aproximação das condições fisiológicas e do microambiente celular nos estudos *in vitro* (Fontana et al., 2020).

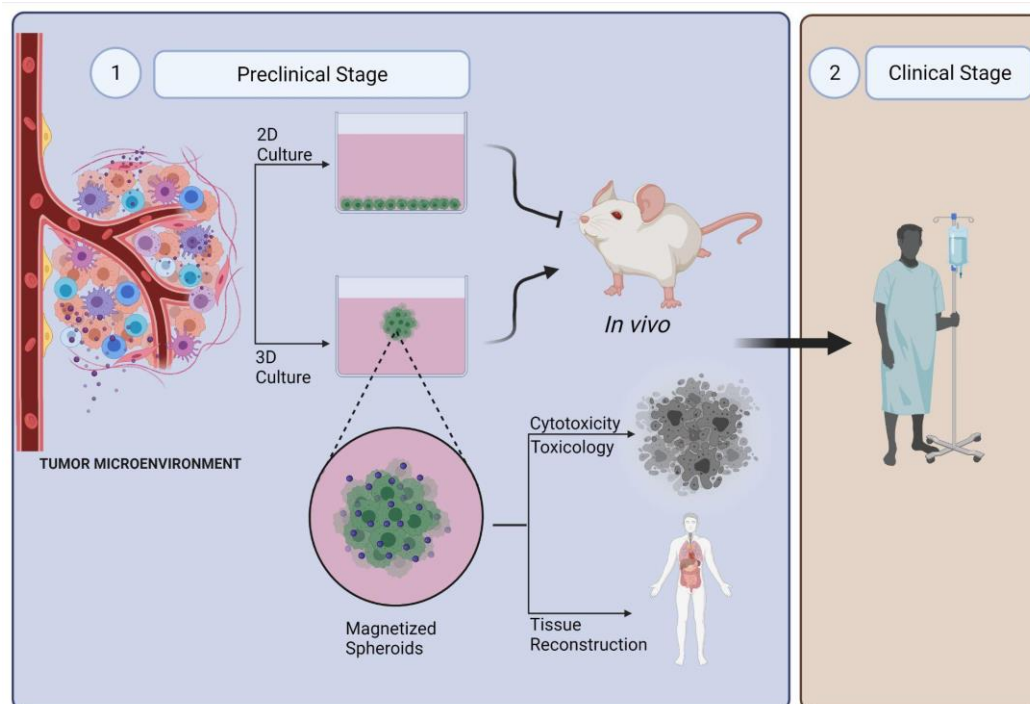


Figura 2: Utilização de células cultivadas em 2D e em 3D para a realização de ensaios pré-clínicos (Caleffi et al., 2021).

Entre os primeiros modelos tridimensionais desenvolvidos está a cultura de explantes. Essa técnica consiste na manutenção de pequenos fragmentos de tecido em condições *in vitro*, utilizando géis ou membranas semipermeáveis, em meio isotônico ou solução nutritiva. Essa abordagem preserva tanto a arquitetura original do tecido quanto sua composição celular. No entanto, a principal limitação desse modelo é sua viabilidade a longo prazo, uma vez que os tecidos tendem à degradação após algumas semanas de cultivo (Nath & Devi, 2016).

Os esferóides estão entre os modelos mais amplamente desenvolvidos e investigados. Esferóides celulares são, em geral, agregados formados por um único tipo de célula epitelial aderente, podendo representar tecidos homogêneos, como músculos ou tumores (Caleffi & Aal, 2021). Um método bastante recente para a formação de esferóides, chamado de cultura celular 3D magnética, consiste na magnetização das células com nanopartículas (Haisler et al., 2013). Sem a necessidade da utilização de arcabouços, esse método leva à magnetização e à consequente união das células formando esferóides, fazendo com que tenham a sua superfície livre para total contato e sinalização com células vizinhas e ainda permitindo a co-cultura direta entre dois ou mais tipos celulares, aproximando o fenótipo celular desses ensaios *in vitro* daqueles encontrados em animais experimentais (Zietarska et al., 2007; Yamada & Cukierman, 2007; Leonard et al., 2010; Caleffi & Aal, 2021).

Por essa maior interação, tais ensaios mostram também maior eficiência no teste de novos fármacos para o tratamento de doenças como o câncer (Jaganathan et al., 2014).

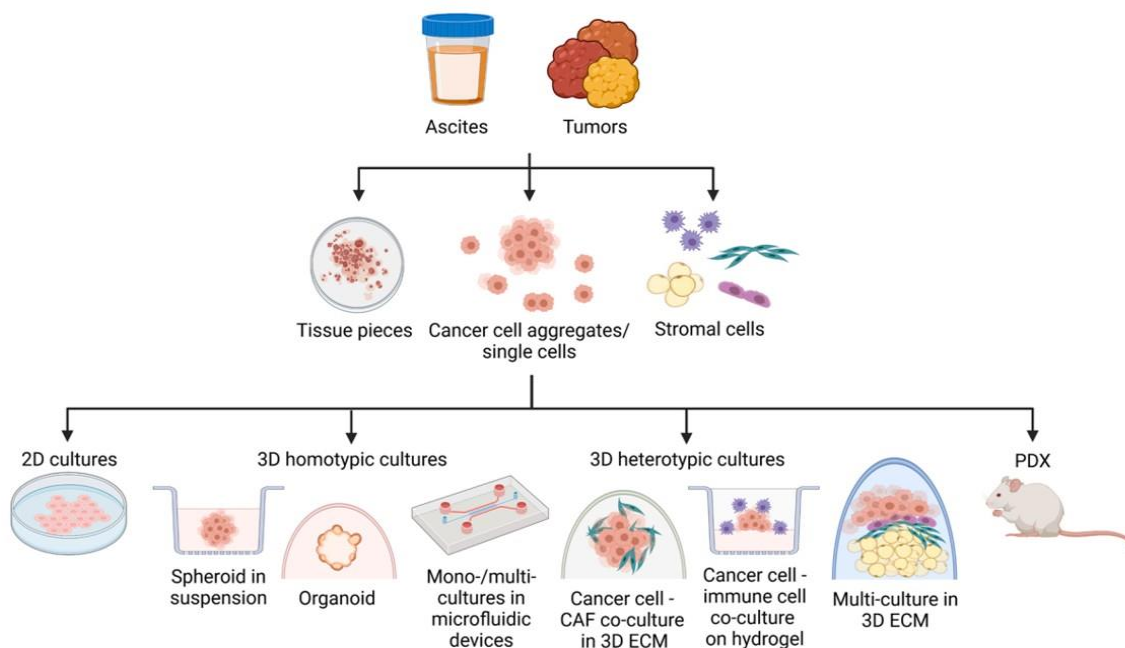


Figura 3: Modelos de estudo de células derivadas de biópsia de pacientes com CO (Schoutrop et al., 2022).



REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. et al. Nitric oxide synthase gene therapy enhances the toxicity of cisplatin in cancer cells. **Journal of Gene Medicine**, v. 11, n. 2, p. 160–168, 2009.
- ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. Products of Chemistry The Discovery and Development of Cisplatin. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 5, p. 728–734, 2006.
- AMPTOULACH, S.; TSAVARIS, N. Neurotoxicity Caused by the Treatment with Platinum Analogues. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2011, p. 1–5, 2011.
- ALSOP, K. et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n.21, p. :2654-2663, 2012.
- ARAUJO, M. et al. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, n. 1, p. 12, 2015.
- BARBOZA, J. R. et al. 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. 1–21, 2020.
- BARTOLOMEU, A. R. et al. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48–55, 2016.
- BEREK, J. S. et al. [Epithelial ovarian cancer (advanced stage): consensus conference (1998)]. **Gynecologie, obstetrique & fertilité**, v. 28, n. 7–8, p. 576–583, 2000.
- BERNARDINO, P. N. et al. Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 104, p. 268–274, 2018.
- BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, SOERJOMATARAM I, JEMAL A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun;74(3):229-263. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4. PMID: 38572751.
- CALEFFI, J. T. et al. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. **Life Sciences**, v. 286, p. 120028, 2021.
- CANNISTRA, S. A. Cancer of the ovary. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 24, p. 2519–2529, 2004.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. SUPPL. 1, p. 1–6, 2002.
- CHEON, C.; KO, S. G. A Phase I Study to Evaluate the Safety of the Herbal Medicine SH003 in Patients With Solid Cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v. 19, p. 1534735420911442, 2020.



2020.

CHIOU, J. F. et al. Comparing the Relationship of Taxol-Based Chemotherapy Response with P-glycoprotein and Lung Resistance-Related Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. **Lung**, v. 181, n. 5, p. 267–273, 2003.

COBO, M. et al. Customizing Cisplatin Based on Quantitative Excision Repair Cross-Complementing 1 mRNA Expression: A Phase III Trial in Non-Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 19, p. 2747–2754, 2007.

COSCIA, F. et al. Integrative proteomic profiling of ovarian cancer cell lines reveals precursor cell associated proteins and functional status. **Nature Communications**, v. 7, p. 12645, 2016.

DA CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.

DE CAMARGO, R. C. R.; DE OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

DE SOUSA, G. F.; WLODARCZYK, S. R.; MONTEIRO, G. Carboplatin: Molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 693–702, 2014.

DU BOIS, A. et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: Final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GFIG OCCC 2004). **Annals of Oncology**, v. 16, n. SUPPL. 8, p. viii7–viii12, 2005.

DUNNERAM, Y.; GREENWOOD, D. C.; CADE, J. E. Diet, menopause and the risk of ovarian, endometrial and breast cancer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 78, n. 3, p. 438-448, 2019.

EASTMAN, A.; BARRY, M. A. Interaction of trans-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation of Monofunctional Adducts and Their Reaction with Glutathione. **Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3303–3307, 1987.

FONTANA, F. et al. Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, n. 18, p. 6806, 2020.

FONTES, A. P. S.; DE ALMEIDA, S. G.; DE ANDRADE NADER, L. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 398–406, 1997.

FRANCHIN, M. et al. Cinnamoyloxy-mammeisin Isolated from Geopropolis Attenuates Inflammatory Process by Inhibiting Cytokine Production: Involvement of MAPK, AP-1, and NF-κB. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 7, p. 1828–1833, 2016.

FRIEDRICH, J., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? **International Journal of Radiation Biology**,



83(11–12), 849–871.

GAITSKELL, K. et al. Angiogenesis inhibitors for the treatment of ovarian cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2011.

GHONEUM, A. et al. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. **Oncotarget**, v. 9, n. 32, p. 22832–22849, 2018.

HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–1949, 2013.

HEINTZ, A. P. M. et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 95 Suppl 1, p. S161–92, 2006.

HO, G. Y.; WOODWARD, N.; COWARD, J. I. G. Cisplatin versus carboplatin: Comparative review of therapeutic management in solid malignancies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 102, p. 37–46, 2016.

HOSSAIN, S. et al. An Overview of the Evidence and Mechanism of Drug–Herb Interactions Between Propolis and Pharmaceutical Drugs. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. April, p. 1–24, 2022.

INCA - Instituto Nacional do Câncer, em:
<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>

JAGANATHAN, H. et al. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–9, 2014.

JUSTINO, I. A. et al. Brazilian red propolis extract free and encapsulated into polymeric nanoparticles against ovarian cancer: formulation, characterisation and biological assays in 2D and 3D models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 806–818, 2023.

KLECZKA, A.; DZIK, R.; KABAŁA-DZIK, A. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Synergistically Enhances Paclitaxel Activity in Ovarian Cancer Cells. **Molecules**, v. 8, n. 15, p. 5813, 2023.

LA VECCHIA, C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 26, n. 1, 2017.

LEONARD, F.; COLLNOT, E. M.; LEHR, C. M. A three-dimensional coculture of enterocytes, monocytes and dendritic cells to model inflamed intestinal mucosa in vitro. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 2103–2119, 2010.

LHEUREUX, S.; BRAUNSTEIN, M.; OZA, A.; M. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 4, p. 280–304, 2019.

LIPPARD, S. J. Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 731–742, 1987.



LIU, S. et al. Overexpression of the lncRNA FER1L4 inhibits paclitaxel tolerance of ovarian cancer cells via the regulation of the MAPK signaling pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 7581–7589, 2019.

MARCHETTI, C. et al. First-line treatment of women with advanced ovarian cancer: focus on bevacizumab. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 1095-1103, 2019.

MCWHINNEY, S. R.; GOLDBERG, R. M.; MCLEOD, H. L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 1, p. 10–16, 2009.

MOORE, K. et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 26, p. 2495-2505, 2018.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 163, p. 94-108, 2016.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Platinum(II) complexes in cancer therapy. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196–209, 2011.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. [s.l: s.n.]. v. 34.

OLIVEIRA, L. P. G. et al. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life Sciences**, v. 217, p. 81–90, 2019.

ORHAN E. et al. Regulation of RAD51 at the Transcriptional and Functional Levels: What Prospects for Cancer Therapy? **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 12, p. 2930, 2021.

OTTEVANGER, P. B. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. **Seminars in Cancer Biology**, v. 44, n. February, p. 67–71, 2017.

PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, n. 3, p. 349–354, 2006.

PASETTO, L. M. et al. The development of platinum compounds and their possible combination. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 60, n. 1, p. 59–75, 2006.

PASUPULETI, V. R. et al. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

PEREIRA, F. A. N. et al. Use of stingless bee propolis and geopropolis against cancer—a literature review of preclinical studies. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 11, p. 1161, 2021.

POKHRIYAL, R. et al. Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients. **Biomarkers in Cancer**, v. 11, p. 1179299X1986081, 2019.

POLAJŽER, S.; ČERNE, K. Precision Medicine in High-Grade Serous Ovarian Cancer:



Targeted Therapies and the Challenge of Chemoresistance. **International Journal of Molecular Science**, v. 26, n. 6, p. 2545, 2025.

PRAT, J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. **Virchows Archiv**, v. 460, p. 237-249, 2012.

REED, E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 24, n. 5, p. 331-344, 1998.

RIPARI, N. et al. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: A review and perspectives for COVID-19 treatment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. February, p. 281-299, 2021.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. **Natural product communications**, v. 10, n. 11, p. 1869-1876, nov. 2015.

ROBERTS, J. et al. Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumour Drugs. **IRL Press**, v. 29, 1986.

ROSENBERG, B. et al. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.

RYAN, S. L. et al. Drug Discovery Approaches Utilizing Three-Dimensional Cell Culture. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 14, n. 1, p. 19-28, 2016.

SCHOUTROP, E. et al. Molecular, cellular and systemic aspects of epithelial ovarian cancer and its tumor microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 86, p. 207-223, 2022.

SCULLY, R. E.; YOUNG, R. H.; CLEMENT, P. B. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. **Clinical Endocrinology**, v. 51, p. 671, 1999.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.

SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, 2011.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2025. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 75, n. 1, p. 10-45, 2025.

SIDERIS M, Menon U, Manchanda R. Screening and prevention of ovarian cancer. **Med J Aust**. 2024 Mar 18;220(5):264-274. doi: 10.5694/mja2.52227. Epub 2024 Feb 14. PMID: 38353066; PMCID: PMC7617385.



SOARES, E. M.; SILVA, S. R. DA. Perfil de pacientes com câncer ginecológico em tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 63, n. 4, p. 517–522, 2010.

SOUZA, A. G.; C FERREIRA, I. C. Advances in Cell Culture: More than a Century after Cultivating Cells. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 6, n. 2, p. 2–5, 2016.

TORRE, L. A. et al. Ovarian cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 284-296, 2018.

WANG, Y. et al. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer metastasis and clinical advancements. **Journal of Translational Medicine**, v. 23, n. 1, p. 539, 2025.

WHEATE, N. J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113–8127, 2010.

WORZFELD, T. et al. The Unique Molecular and Cellular Microenvironment of Ovarian Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p. 24, 2017.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. **Cell**, v. 130, n. 4, p. 601–610, 2007.

YANG, H. et al. Age at menarche and epithelial ovarian cancer risk: A meta-analysis and Mendelian randomization study. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 8, p. 4012-4022, 2019.

ZIETARSKA, M. et al. Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). **Molecular carcinogenesis**, v. 46, n. 10, p. 872–885, out. 2007.



Capítulo I

Atividade Antitumoral da Geoprópolis em Associação à Carboplatina em Células Tumorais Ovarianas

1. Justificativa e Hipótese

Considerando a problemática do diagnóstico frequentemente tardio e da resistência das células de CO ao tratamento quimioterápico, se faz necessário o estudo de novas estratégias para otimizar a ação desses medicamentos. Assim, este estudo se alinha com Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (ODS 3) da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), que visa “assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades”, uma vez que a problemática citada impacta diretamente a qualidade de vida e a sobrevida das pacientes. Dessa forma, torna-se essencial contribuir com novos achados científicos sobre a ação do composto natural geoprópolis no tratamento combinado para o CO, na tentativa de otimizar o efeito do quimioterápico de primeira linha na destruição efetiva das células tumorais.

A partir das informações acima descritas, a hipótese deste trabalho é que a geoprópolis seja capaz de potencializar a atividade citotóxica da carboplatina, reduzindo a resistência das células neoplásicas ao composto, diminuindo a atividade migratória e, portanto, metastática do CO.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da geoprópolis isoladamente e combinada ao quimioterápico carboplatina sobre células tumorais de ovário de alta agressividade, cultivadas em sistema bidimensional e tridimensional.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o impacto de diferentes doses e tempos de exposição de geoprópolis isolada e em combinação com carboplatina em linhagens de CO em modelo bi e tridimensional;



- Avaliar a viabilidade das células de CO e de uma linhagem celular não-tumoral, expostas aos compostos isolados e combinados;
- Analisar o efeito das diferentes exposições sobre o processo migratório das células neoplásicas em modelo bi e tridimensional;
- Analisar o efeito das exposições aos tratamentos sobre o processo de morte das células neoplásicas;
- Analisar o efeito das exposições aos tratamentos na sinalização de proliferação e morte de células de linhagem celular agressiva de CO;
- Analisar o efeito das exposições aos tratamentos quanto à expressão do marcador característico deste tipo tumoral – Rad51.

3 Material e Métodos

3.1 Linhagens Celulares

As linhagens celulares SKOV3 (células metastáticas de adenocarcinoma epitelial ovariano de alto grau derivado de ascite humana), OVCAR-3 (células metastáticas originadas de ascite de adenocarcinoma progressivo humano) e HFF-1 (fibroblastos humanos normais) foram adquiridas junto à *American Type Cell Culture* (ATCC) (Manassas, Virginia, USA), e depositadas no banco de células nível 2 de biossegurança (Processo CTNBio nº 01200.007359/2001-11) do Laboratório de Cultura Celular do Setor Morfologia/IBB/UNESP, sob coordenação da orientadora desta proposta. A linhagem celular OVCAR-8 (células metastáticas de adenocarcinoma epitelial ovariano humano avançado, quimioresistentes à cisplatina e carboplatina) foram analisadas em experimentos desenvolvidos durante o estágio internacional na Mayo Clinic, no laboratório do Dr. Alexander Revzin. Cada linhagem celular foi cultivada individualmente em meio de cultura específico suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco/Invitrogen™, EUA), em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C. Os meios foram trocados a cada 2 dias durante a expansão em garrafas de poliestireno de 25 e 75 cm² e o monitoramento das culturas foi realizado em microscópio invertido (Zeiss Axiovert®, Alemanha). Quando as células atingiram 80% de confluência foram submetidas à tripsina 0,25% (Gibco/Invitrogen™, EUA) e os experimentos delineados. O comitê de ética não se faz necessário por tratar-se de linhagem celular estabelecida e patenteada pela empresa ATCC, que mantém a responsabilidade sobre as células.

3.2 Cultura celular tridimensional

3.2.1 Formação de esferóides tumorais a partir de Placas ultra-low attachment

Células da linhagem SKOV-3 foram cultivadas em cultura bidimensional para a expansão e, após tripsinização, ressuspensão e contagem, as células foram plaqueadas em placas *ultra-low attachment U-shaped* (NuncloTM SpheraTM 96-Well, Nunclo Sphera-Treated, U-Shaped-Bottom Microplate, 174925, Thermo ScientificTM) nas concentrações de $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $1,5 \times 10^4$ e 2×10^4 células/poço, e mantidas em meio de crescimento durante 72 horas, sendo fotografadas a cada 24 horas. Ao final das 72 horas, foi realizado um ensaio de viabilidade para averiguar se as condições de manutenção dos esferóides estavam adequadas. Para fins de comparação, o mesmo padrão de formação de esferóides foi realizado para a linhagem OVCAR-3. A concentração de trabalho escolhida foi a de 10^4 células/poço, de acordo com a padronização. Os esferóides receberam meio de crescimento contendo as diferentes exposições, de acordo com os grupos experimentais descritos no item 3.5, após 48 horas de sua formação e estabilização e foram mantidos por 72 horas.

3.2.2 Formação de esferóides a partir de dispositivos de microfluídica

Células da linhagem OVCAR-8 foram cultivadas em cultura bidimensional para expansão e, após tripsinização, ressuspensão e contagem, foram plaqueadas em dispositivos de microfluídica nas concentrações de 2×10^6 /mL, 3×10^6 /mL e 4×10^6 /mL, mantidas em meio de crescimento contendo 0%, 1% e 2% de matrigel durante 12, 24 e 48 horas. O meio de crescimento contendo matrigel foi substituído por meio de crescimento convencional e mantido por até 7 dias, recirculando o meio todos os dias. Ao final desse período foi realizado ensaio de marcação fluorescente com calceína AM e Iodeto de propídio para averiguar as melhores condições de cultivo.

A concentração de trabalho escolhida foi a de 2×10^6 células/mL, que foram então plaqueadas nos dispositivos da seguinte forma: 70 μ L da suspensão de células em meio de crescimento foi adicionada em um dos reservatórios de meio e 30 μ L da mesma suspensão foi adicionada no lado oposto para criar uma diferença na pressão hidrostática e movimentar as células para dentro do dispositivo. Passado um minuto, quando o volume é equilibrado, e as células param de circular, o fluxo é invertido, movimentando 30 μ L da suspensão celular para o reservatório que recebeu menor volume de meio. Aguardamos mais um minuto até que todos os micropoços tenham recebido o mesmo número de células e o volume de meio se estabilize em ambos os reservatórios. Quando o fluxo parou, lavamos os reservatórios com meio de



crescimento para remover as células que não entraram nos micropoços. Meio de crescimento com 1% de matrigel foi adicionado, os dispositivos foram acondicionados em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C. Após 24 horas os esferóides já estavam formados e o meio com 1% de matrigel foi substituído por meio de crescimento suplementado de acordo com os grupos de tratamento descritos no item 4.5. Os dispositivos foram mantidos por 5 dias, sendo recirculados a cada 24 horas, aspirando 50µL de um reservatório de meio e dispensando em outro.

3.3 Obtenção da amostra de geoprópolis

A geoprópolis produzida por abelhas sem ferrão *Melipona fasciculata* Smith a partir de colmeias localizadas no município de Palmeirândia (2° 39' S, 44° 55' O), pertencente à microrregião da baixada ocidental maranhense, foi fornecida pelo apicultor Sr. Manuel Barros ao colaborador deste estudo, Prof. José Maurício Sforcin. Esta amostra de geoprópolis apresenta como principais características organolépticas: fragmentos duros, grânulos de consistência heterogênea, aroma inodoro, cor marrom escura e sabor amargo (DUTRA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009). A geoprópolis foi coletada com auxílio de espátulas esterilizadas e mantida a 4°C.

3.4 Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis

A amostra de geoprópolis (30g) foi triturada e macerada em etanol 70%, a temperatura ambiente e sob moderada agitação. Após 24 h, o material foi filtrado e a concentração final calculada, obtendo-se o peso seco do extrato hidroalcoólico de geoprópolis (mg/mL). O extrato foi acondicionado em frasco âmbar, mantido sob refrigeração (4°C) e foi diluído em meio RPMI 1640, para obtenção das concentrações desejadas (ABREU *et al.*, 2006; DUTRA *et al.*, 2008).

3.5 Exposição das células aos compostos

Grupos Experimentais: Os diferentes tipos celulares foram divididos em grupos experimentais, sendo inicialmente testadas diferentes concentrações de cada composto isolado, bem como suas combinações, por fim, as concentrações que se adequaram ao critério de inclusão de IC₂₅ (2D) e melhor dose de inibição (3D) seguiram para os demais experimentos como detalhado na Figura 1.

Linhagem	Tipo	Meio de cultivo	Suplementação	Carboplatina μM	Geoprópolis $\mu\text{g/mL}$
HFF-1	2D	DMEM	10% SFB + 1% anti-anti	-	25, 50, 75 e 100
SKOV-3	2D	RPMI	10% SFB + 1% anti-anti	85	85
SKOV-3	3D	RPMI	10% SFB + 1% anti-anti	42.5	127.5
OVCAR-3	3D	RPMI	20% SFB + 1% anti-anti + 0.0128mg/mL insulina	127.5	85
OVCAR-8	3D	RPMI	10% SFB + 1% anti-anti	25	340

Figura 1: Condições de cultivo e parâmetros experimentais utilizados para as linhagens HFF-1, SKOV-3, OVCAR-3 e OVCAR-8, incluindo o tipo de modelo (2D ou 3D), meio de cultura, suplementação e concentrações de carboplatina e geoprópolis aplicadas.

3.6 Viabilidade celular através do ensaio MTT

Para determinação da viabilidade após exposição aos compostos, células das linhagens SKOV-3 e HFF-1 ($n = 4$) foram cultivadas em 2D (de acordo com a metodologia descrita no item 3.1), foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e após atingir confluência (48 horas), foram expostas aos compostos descritos no item 3.5; e 3D (de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.1) e expostas ao meio de cultura suplementado de acordo com a descrição de cada grupo (conforme descrito no item 3.5). Para os ensaios 2D, foi adicionado a cada poço 200 μL de solução incubadora, sendo 5mg/mL do reagente MTT (Sigma-AldrichTM, M2128) diluído em meio sem SFB nos poços de cultura. Para o ensaio realizado nos esferóides, ao final do tratamento, foi adicionado 10 μL da solução de MTT, sendo a concentração final nos poços 5mg/mL. A incubação do MTT foi realizada por 3 horas em estufa com 5% de CO_2 em atmosfera úmida a 37°C em ambas as condições. O sobrenadante foi então substituído em cada poço por 200 μL DMSO antes da leitura, realizada em um aparelho de leitura ELISA em filtro de 580nm. Os valores de absorbância das amostras do grupo controle foram comparados aos valores dos grupos expostos, seguido de análise estatística.

3.7 Viabilidade através de marcação fluorescente com Calceína AM e Iodeto de Propídio (PI)

Essa análise permite avaliar viabilidade celular e apoptose em uma população com base na integridade da membrana plasmática e na atividade das enzimas esterases. Como resultado, células vivas e células mortas foram identificadas simultaneamente, colorindo com calceína-AM verde fluorescente para indicar atividade esterase intracelular, e iodeto de propídio fluorescente vermelho para indicar perda de integridade da membrana plasmática. Para isso, as

células da linhagem OVCAR-8 foram cultivadas em modelo 3D (n=3) em dispositivos de microfluídica (a metodologia completa está descrita no capítulo II) durante cinco dias em meio de cultura suplementado de acordo com a descrição do grupo. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e adicionado 130µL de reagente de marcação (1mL de PBS + 0,5µL de calceína + 2µL de PI). As células foram incubadas com a solução durante 60 minutos em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C, recirculando a cada 15 minutos e em seguida o dispositivo foi levado ao microscópio invertido de fluorescência para a obtenção das imagens.

3.8 Apoptose em esferóides OVCAR-8 após 5 dias de tratamento

Essa análise permite avaliar a ativação das caspases -3 e -7 por meio da sonda fluorescente indicativa de células em processo de apoptose. Para isso, células da linhagem OVCAR-8 foram cultivadas em 3D (n=3) em dispositivos de microfluídica, conforme descrito no item 3.3.2, em seguida os tratamentos foram adicionados seguindo os respectivos grupos experimentais acrescido de 1µL de *CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagent* (Thermo Fisher, Cat. No. C10423) conforme instruções do fabricante. O sinal fluorescente foi fotocomentado após uma hora de incubação e a cada 24 horas, durante 5 dias de tratamento.

3.9 Ensaio de Imunofluorescência para análise da proliferação, citoesqueleto, junções celulares e reparo de DNA em esferóides de OVCAR-8

Para isso, células da linhagem OVCAR-8 foram cultivadas em 3D (n=3) em dispositivos de microfluídica, conforme descrito no item 3.3.2, em seguida os tratamentos foram adicionados seguindo os respectivos grupos experimentais e mantido por 5 dias, sendo recirculados a cada 24 horas. Ao fim do tratamento foi realizada a fixação com PFA 4%, seguida de permeabilização com solução contendo 0,5% Triton X-100 em PBS 1x suplementada com 1% de BSA, por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS, a etapa de bloqueio foi conduzida utilizando 5% de BSA na mesma solução tampão por 1 hora. As amostras foram então incubadas com o anticorpo primário (KI67 ou Rad51) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, foram realizadas lavagens com PBS e posterior incubação com o anticorpo secundário conjugado (faloidina ou ZO-1), juntamente com DAPI para marcação nuclear, por 1 hora à temperatura ambiente, protegidas da luz. Por fim, os dispositivos foram lavados, e mantidos em PBS para fotodocumentação em microscópio confocal.

3.10 Ensaio de Migração Celular Bidimensional – técnica de Wound Healing

A capacidade de migração das células SKOV-3 após exposição aos grupos experimentais foi avaliada pelo ensaio de *Wound Healing*. Para o ensaio de migração, as células SKOV-3 foram semeadas na concentração de 1×10^6 células/cm² em placas de 6 poços e 24 horas depois, com as células em confluência aproximada de 90%, foi feita uma ranhura central em cada poço utilizando uma ponteira para micropipeta de 200µL. Em seguida os poços foram lavados com PBS para remover as células remanescentes na ranhura, e os tratamentos foram adicionados seguindo os respectivos grupos experimentais descritos para os experimentos em 2D (conforme item 3.5). O fechamento da ranhura foi acompanhado a cada 24 horas até o completo fechamento (0, 24 e 48 horas). O fechamento foi analisado e quantificado usando o *software ImageJ*.

3.11 Ensaio de Migração Celular Tridimensional - A partir dos esferóides

Esferóides celulares formados como descrito no item 4.2.2 foram tratados de acordo com os grupos experimentais durante 72 horas e transferidos para uma placa de 6 poços contendo meio de cultura livre dos tratamentos. Cada poço recebeu 15 esferóides previamente formados em um volume de 3 mL de meio. Os esferóides foram fotodocumentados nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h para análise da aderência e migração das células da periferia do esferóide. Ao final, essas imagens foram analisadas no software Image J para a quantificação da área total dos esferóides nos diferentes tempos registrados. A média dos esferóides para cada grupo experimental foi utilizada para a comparação dos efeitos dos compostos na migração celular.

3.12 Análise de Interação via Synergy Finder

A análise da interação entre a geoprópolis e a carboplatina foi realizada por meio da plataforma online SynergyFinder v2.0 (<https://synergyfinder.fimm.fi>), utilizando o modelo *Zero Interaction Potency* (ZIP). Esse modelo considera que, na ausência de interação, o efeito combinado de dois compostos deve ser equivalente à soma de seus efeitos individuais, ajustado pela potência relativa de cada um. A plataforma gera mapas de sinergismo em formato tridimensional (curvas de superfície) e matrizes de resposta à dose, além de calcular um escore de sinergismo global (*ZIP synergy score*).

Os escores ZIP foram interpretados da seguinte forma (de acordo com a recomendação da própria plataforma): valores menores que -10 indicam interação antagônica; escores entre -10 e +10 sugerem interação aditiva; e valores acima de +10 indicam interação sinérgica. Para cada linhagem celular, os dados de viabilidade foram inseridos em formato matricial e

analisados considerando todas as combinações de doses testadas dos dois compostos.

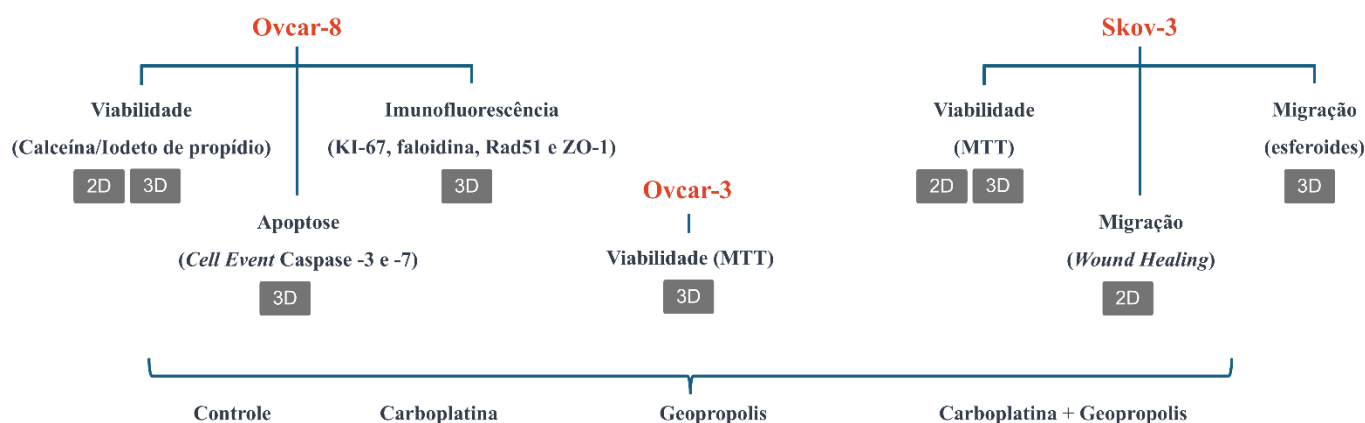


Figura 2: Representação esquemática dos ensaios realizados nas linhagens OVCAR-3, OVCAR-8 e SKOV-3, cultivadas em modelos bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D), submetidas aos tratamentos com carboplatina, geoprópolis ou à associação de ambos. Foram avaliados os parâmetros de viabilidade celular (MTT, Calceína/Iodeto de propídio), apoptose (Caspase-3/-7), migração (esferoides e *wound healing*) e expressão de marcadores proliferação e reparo por imunofluorescência (KI-67, faloidina, Rad51, ZO-1).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado o teste estatístico para análise de normalidade seguido de análise variância (ANOVA ou Welch's ANOVA) com um único fator independente "tratamento", complementado com o teste de Tukey para amostras homocedásticas ou Games-Howell para heterocedásticas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O software GraphPad Prism 9.2 foi utilizado para representação gráfica dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1 Análise de citotoxicidade da Geoprópolis em células normais

Fibroblastos normais da linhagem HFF-1 foram expostas à geoprópolis nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24, 48 e 72 horas (Figura 2). O ensaio MTT mostrou que nenhuma das concentrações testadas diminuiu a viabilidade celular mesmo após o maior período de exposição (72 horas). O solvente de dissolução da geoprópolis (EtOH) também foi testado, sendo que a viabilidade deste grupo não apresentou diferença em comparação ao controle.

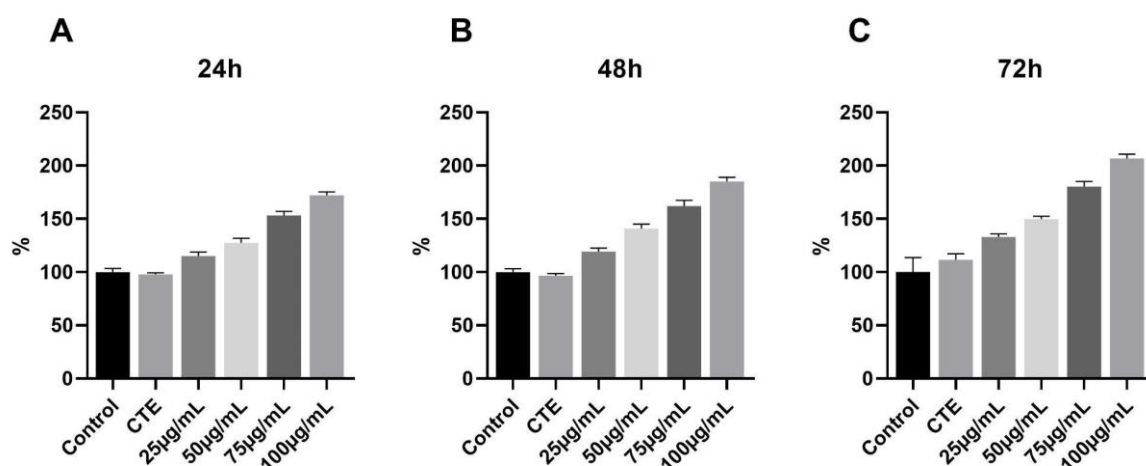


Figura 3: Análise de viabilidade das células HFF-1 expostas à geoprópolis. Control (meio de crescimento), CTE (meio de crescimento adicionado do veículo EtOH 70%), 25, 50, 75 e 100 µg/mL (meio de crescimento suplementado com geoprópolis nas respectivas concentrações). A) 24 horas. B) 48 horas. C) 72 horas.

5.2 Padronização dos esferóides de células SKOV-3

Na construção dos esferóides de células SKOV-3 observamos a formação de aglomerados celulares tridimensionais concisos, com bordas regulares e diferentes centros de oxigenação (Figura 3). A concentração celular inicial escolhida foi de 1×10^4 células por poço e o tempo de incubação de 48 horas.

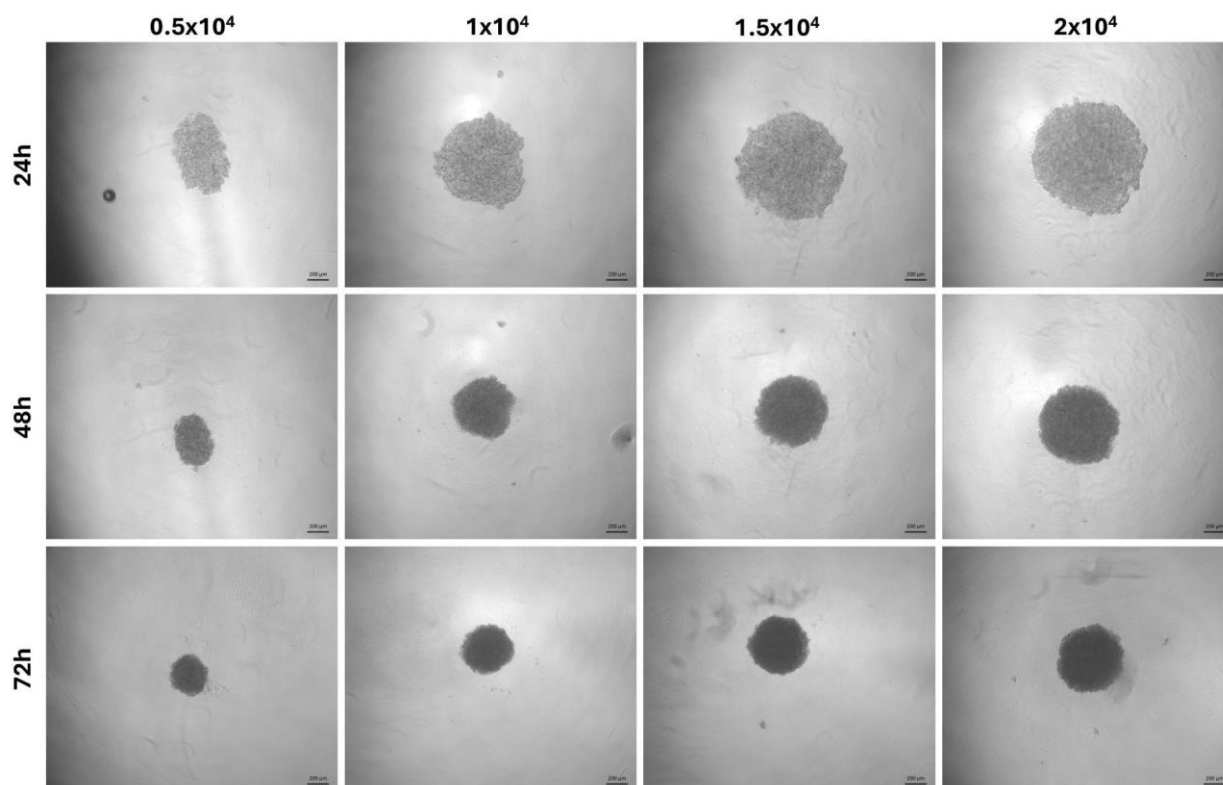


Figura 4: Padronização dos esferóides de células SKOV-3 a partir das concentrações de $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 , $1,5 \times 10^4$ e 2×10^4 células/poço, cultivadas por 24, 48 e 72 horas.

5.3 Citotoxicidade via MTT e via marcação fluorescente (Calceína AM e Iodeto de propídio)

Com o objetivo de avaliar o potencial citotóxico da geoprópolis, isoladamente e em combinação com a carboplatina, esferóides das diferentes linhagens celulares de câncer de ovário SKOV-3, OVCAR-3 e OVCAR-8 foram expostos por 72 horas a diferentes concentrações dos compostos. A viabilidade celular foi então mensurada por meio do ensaio de MTT para as linhagens SKOV-3 e OVCAR-3 e marcação fluorescente com Calceína AM e Iodeto de propídio para OVCAR-8.

Na linhagem SKOV-3 (Figura 4A), o tratamento com carboplatina ($42,5 \mu\text{M}$) e geoprópolis ($127,5 \mu\text{g/mL}$) isolados não alterou a viabilidade significativamente comparados ao controle. A combinação de ambos os compostos promoveu uma redução da viabilidade celular em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e ao grupo tratado individualmente com carboplatina ($p < 0,01$). Enquanto geoprópolis e carboplatina foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Na linhagem OVCAR-3 (Figura 4B), a exposição à carboplatina ($127,5 \mu\text{M}$) e à geoprópolis ($85 \mu\text{g/mL}$) também causou diminuição significativa da viabilidade celular em comparação ao controle ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). O tratamento combinado

potencializou esse efeito, resultando em uma redução mais expressiva da viabilidade em relação aos tratamentos isolados ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

De forma semelhante, na linhagem OVCAR-8 (Figura 4C), observou-se uma significativa redução da viabilidade celular após tratamento com carboplatina (25 μ M) e geoprópolis (340 μ g/mL) individualmente ($p < 0,0001$). A associação dos dois compostos apresentou o maior efeito citotóxico, com diminuição ainda mais pronunciada da viabilidade celular quando comparada aos tratamentos isolados ($p < 0,0001$).

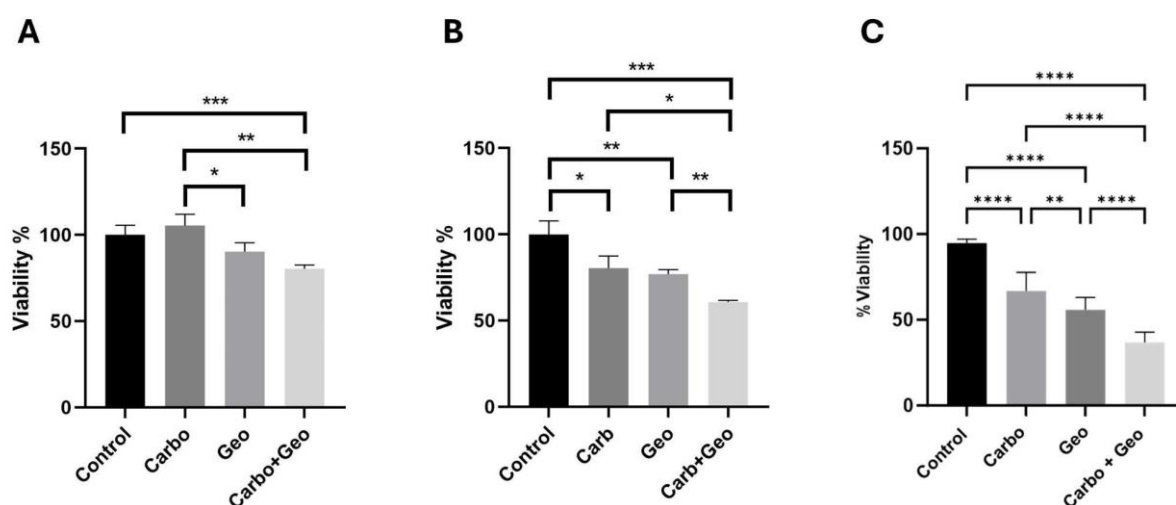


Figura 5: Análise de viabilidade dos esferóides de câncer de ovário. **A)** Skov-3: Carbo 42.5 μ M, Geo 127.5 μ g; **B)** Ovar-3: Carbo 127.5 μ M, Geo 85 μ g; **C)** Ovar-8: Carbo 25 μ M, Geo 340 μ g. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.4 Análise de Interação entre Geoprópolis e Carboplatina por Modelagem ZIP

A interação entre geoprópolis e carboplatina foi avaliada nas linhagens de câncer de ovário SKOV-3 e OVCAR-3 utilizando o modelo Zero Interaction Potency (ZIP) por meio da plataforma *SynergyFinder* (Figura 5). Esse modelo quantifica desvios da resposta esperada para combinações de fármacos sem interação, gerando um escore de sinergismo global (ZIP synergy score).

Na linhagem SKOV-3, o escore ZIP foi de -0,923, enquanto na linhagem OVCAR-3 foi de 2,577. De acordo com os critérios da plataforma, escores entre -10 e +10 são interpretados como indicativos de interação aditiva, ou seja, não há evidência robusta de sinergismo ou antagonismo entre os compostos nas condições testadas.

As curvas de superfície (Figura 5A) mostram distribuição mista de áreas com interações levemente positivas (tons vermelhos) e negativas (tons verdes), reforçando a ausência de um

padrão claro de sinergismo ou antagonismo. A matriz de resposta à dose (Figura 5B) revela que, nas duas linhagens, a inibição da viabilidade celular aumenta com doses mais elevadas dos compostos, mas sem evidência de efeito combinado superior ao esperado para uma interação aditiva.

Portanto, os resultados sugerem que a combinação de geoprópolis e carboplatina apresenta um efeito aditivo nas linhagens avaliadas, sem caracterizar sinergismo ou antagonismo significativo conforme os critérios do modelo ZIP.

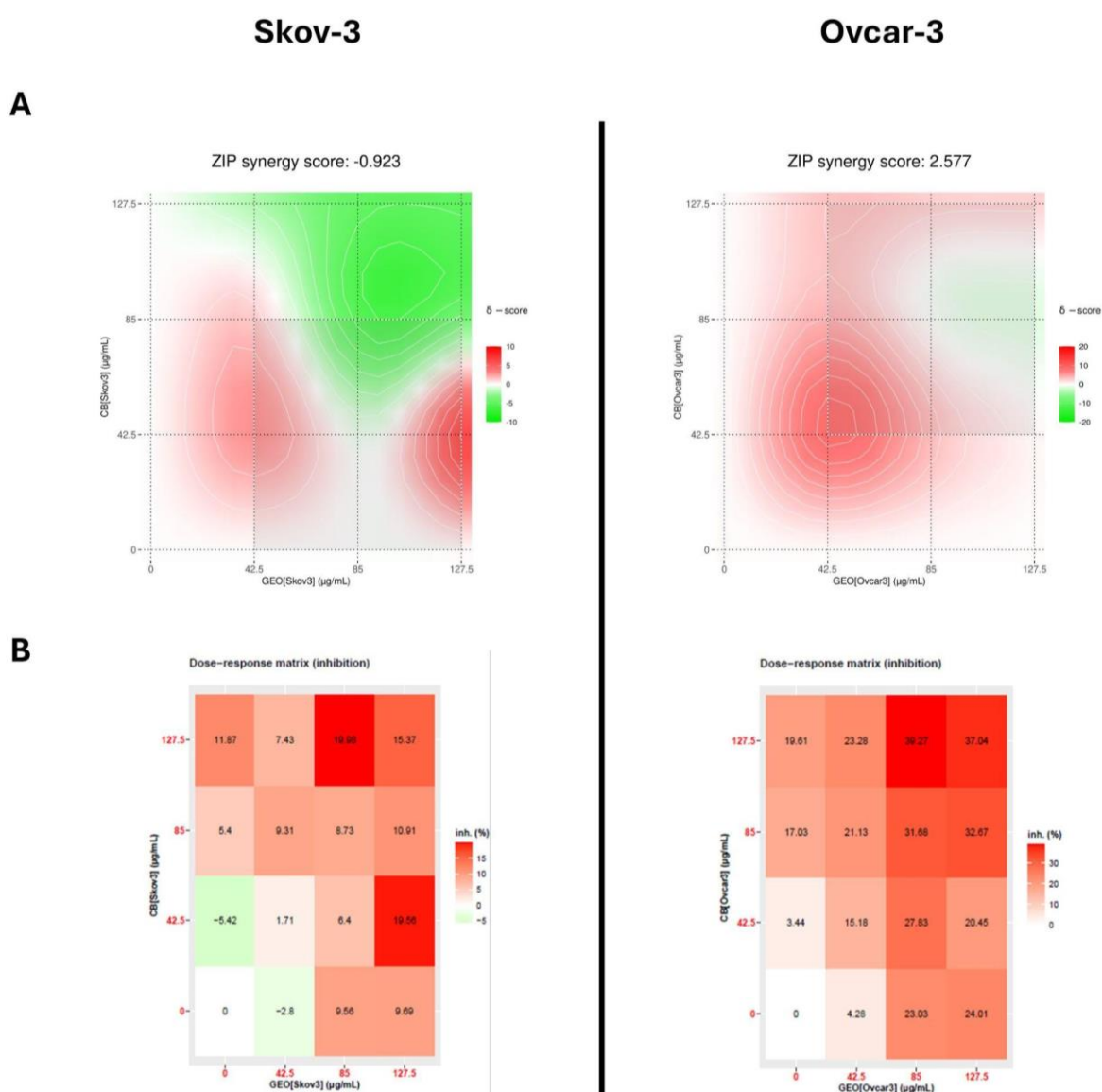


Figura 6: Análise de Sinergismo entre carboplatina e geoprópolis nas linhagens de câncer de ovário SKOV-3 e Ovcar-3 utilizando o modelo ZIP. **A)** Mapas de sinergismo (superfície 3D) demonstrando as regiões de interação com base nos escores ZIP. Áreas em vermelho indicam interação positiva (sinergismo), enquanto áreas em verde representam interação negativa (antagonismo). Os escores ZIP obtidos foram -0,923 para SKOV-3 e 2,577 para OVCAR-3, valores que indicam interação aditiva



conforme os critérios da plataforma. **B)** Matrizes de resposta à dose expressas em porcentagem de inibição da viabilidade celular. A intensidade da cor vermelha reflete maior inibição da viabilidade, e os valores numéricos correspondem à média percentual de inibição para cada combinação de doses. *SynergyFinder* v2.0 (<https://synergyfinder.fimm.fi>).

5.5 Viabilidade Celular via marcação fluorescente em esferóides OVCAR-8 após 5 dias de tratamento

A análise da viabilidade celular foi realizada em esferóides da linhagem OVCAR-8 (Figura 6) utilizando o ensaio de fluorescência com os corantes *Calcein AM* (marca células vivas – fluorescência verde) e *Iodeto de propídio* (marca células mortas – fluorescência vermelha), conforme as instruções do fabricante.

As imagens representativas mostram a morfologia e a viabilidade dos esferóides no Dia 0 (após formação dos agregados celulares) e no Dia 5, após exposição aos diferentes tratamentos: controle, carboplatina (25 μ M), geoprópolis (340 μ g) e a combinação de ambos. Observa-se que os esferóides do grupo controle mantiveram-se predominantemente a fluorescência verde, indicando alta viabilidade celular. O tratamento com carboplatina isoladamente promoveu aumento moderado da fluorescência vermelha, sugerindo morte celular induzida pela quimioterapia. De modo semelhante, o grupo tratado apenas com geoprópolis também apresentou células mortas, porém de forma menos acentuada.

Notavelmente, a combinação de carboplatina (25 μ M) com geoprópolis (340 μ g) resultou em um aumento expressivo da fluorescência vermelha nos esferóides, indicando intensa perda de viabilidade celular comparada aos tratamentos individuais, evidenciando efeito aditivo ou potencializado da associação.

Esses achados qualitativos corroboram com os dados quantitativos de viabilidade celular (Figura 4C), nos quais a combinação resultou em redução significativa da viabilidade em comparação aos grupos tratados individualmente ($p < 0.0001$). Este resultado sugere que a associação dos compostos promoveu efeito biológico relevante sobre a viabilidade dos esferóides tumorais.

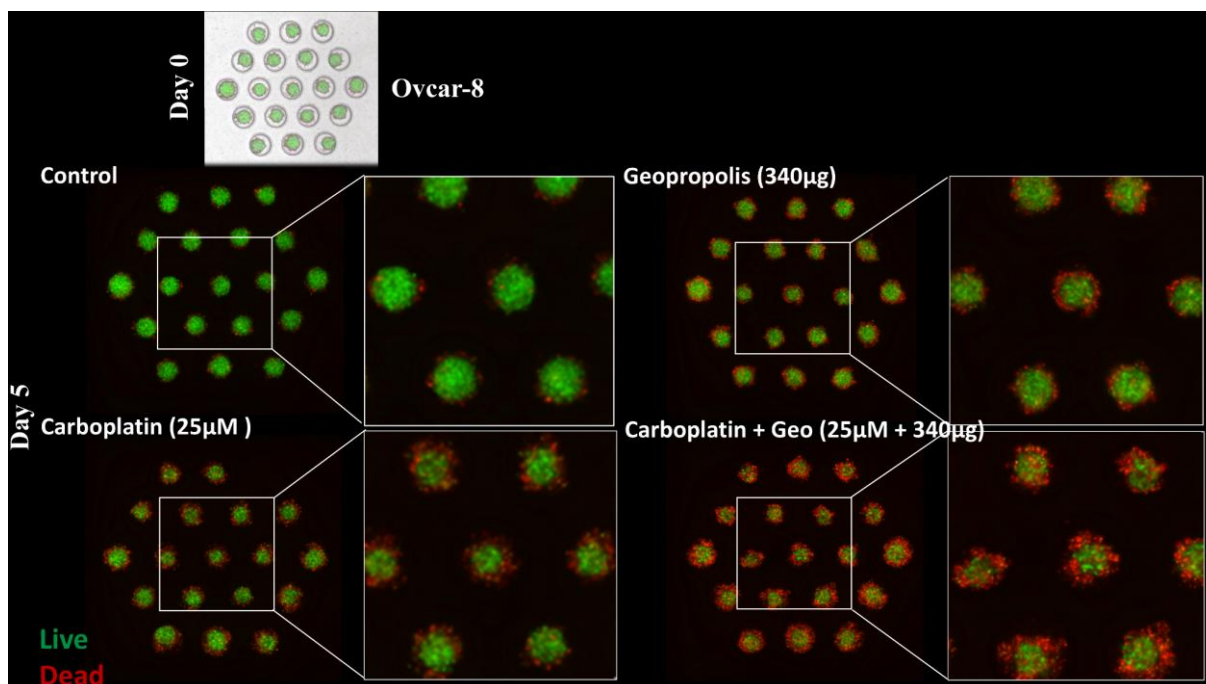


Figura 7: Análise da viabilidade de esferóides OVCAR-8 tratados com carboplatina (25 µM) e geoprópolis (340 µg). Imagens de fluorescência obtidas no dia 5 após coloração com Calceína AM e Iodeto de propídio, onde células viáveis aparecem em verde (Calceína AM) e células mortas em vermelho (Iodeto de propídio).

5.6 Apoptose em esferóides OVCAR-8 após 5 dias de tratamento

A ativação das caspases-3 e -7 foi avaliada nos esferóides da linhagem OVCAR-8 por meio da sonda fluorescente *CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagent* (Thermo Fisher, Cat. No. C10423), durante 5 dias de tratamento (dados não mostrados). Essa sonda é ativada especificamente na presença de caspases-3/7 ativas, resultando em fluorescência verde indicativa de células em processo de apoptose.

Nas imagens adquiridas por microscopia de fluorescência (Figura 7), observou-se aumento progressivo da fluorescência ao longo do tratamento, no grupo tratado com carboplatina (25 µM), e na combinação, enquanto que o grupo tratado apenas com geoprópolis (340 µg/mL) e o grupo controle apresentaram sinal basal.

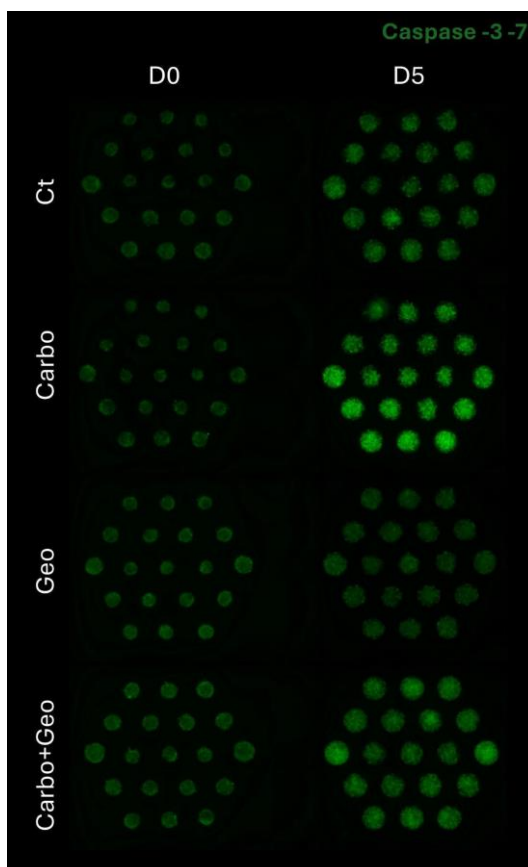


Figura 8: Detecção de apoptose em esferóides da linhagem OVCAR-8 tratados com carboplatina (25 μ M), geoprópolis (340 μ g/mL) ou sua combinação. A fluorescência verde indica a ativação de caspases-3/7.

5.7 Ensaio de migração celular - Wound Healing

O ensaio de cicatrização (*wound healing*) foi realizado para avaliar o efeito da carboplatina (85 μ M), da geoprópolis (85 μ g) e da combinação de ambos na migração das células SKOV-3, cultivadas em cultura bidimensional, ao longo de 48 horas. As imagens (Figura 8A) obtidas em diferentes intervalos de tempo (0, 24 e 48h) demonstram que as células tratadas com carboplatina, geoprópolis ou a combinação apresentaram menor fechamento da área da ferida em comparação ao controle.

A análise quantitativa (Figura 8B) confirma que todas as condições tratadas resultaram em menor porcentagem de cobertura da ferida ao longo do tempo, com a combinação de carboplatina e geoprópolis sendo a que apresentou a menor taxa de migração celular, se mostrando pouco alterada ao longo do tempo observado.

O gráfico ilustrado pela Figura 8C reforça a significância estatística dessa redução, indicando que os tratamentos isolados já comprometem a capacidade migratória das células, sendo esse efeito ainda mais evidente na condição combinada dos compostos.

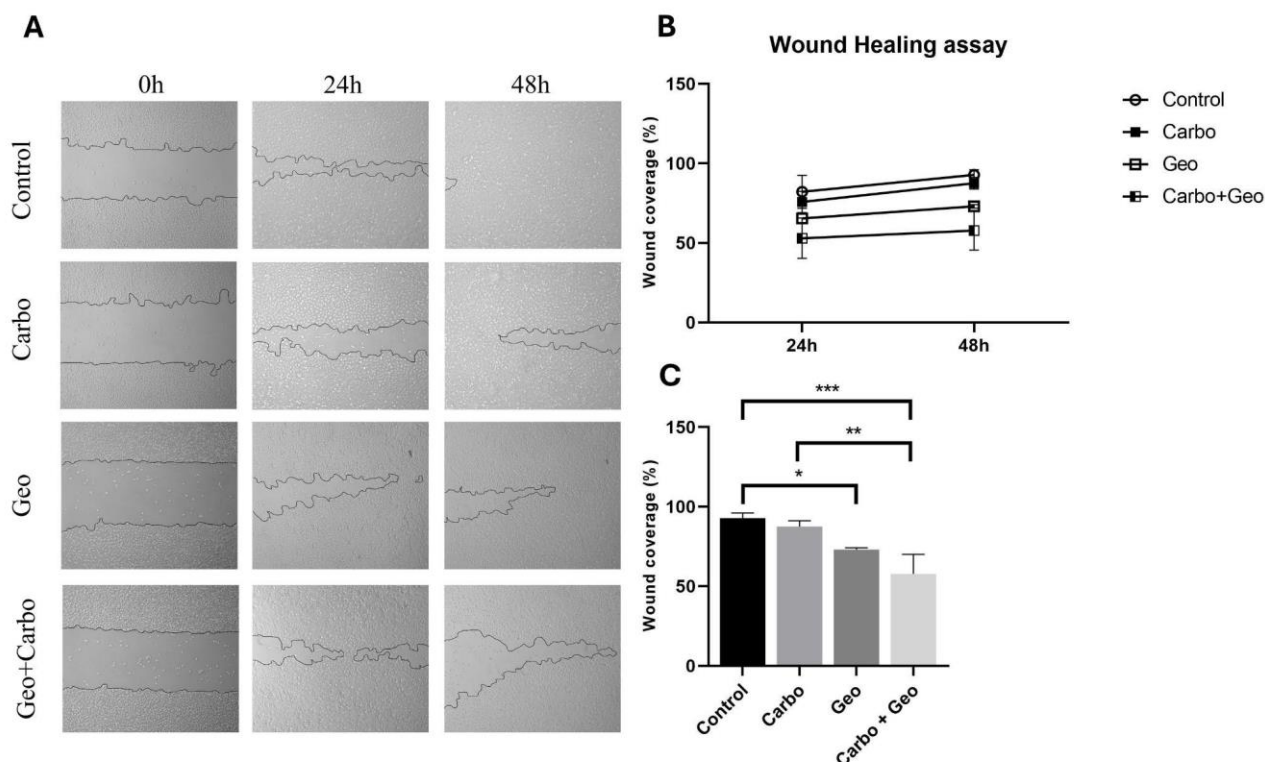


Figura 9: Análise da migração celular pelo ensaio de cicatrização em células de câncer de ovário - SKOV-3 tratadas com carboplatina (85 μ M), geoprópolis (85 μ g) ou a combinação de ambos por 48 horas. (A-) Imagens representativas da área da ferida nas condições: controle, Carbo, Geo e Carbo+Geo nos tempos 0, 24 e 48h. (B)- Quantificação da área de fechamento da ferida em 24h e 48h (% de *wound coverage*). (C)- Análise estatística da porcentagem de cobertura da ferida após 48h de tratamento. Os dados estão expressos como média $\pm$ DP. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5.8 Ensaio de migração a partir de esferóides de células SKOV-3

O ensaio de migração dos esferóides foi realizado para avaliar o efeito da carboplatina (45 μ M), da geoprópolis (127,5 μ g) e da combinação de ambos na migração das células SKOV-3, cultivadas em cultura tridimensional, ao longo de 72 horas. As imagens (Figura 9A) obtidas a cada 24 horas e um período total de 72 horas (0, 24, 48 e 72h) demonstraram que as células tratadas com carboplatina, geoprópolis ou a combinação apresentaram menor atividade migratória em comparação ao controle.

A análise quantitativa ao longo do tempo (Figura 9B) mostra que, no grupo tratado com carboplatina, a migração das células ao redor do esferóide acontece de maneira mais lenta que no grupo controle, mas todos os esferóides plaqueados aderiram e a migração acontece com gradativo aumento ao longo das 72 horas observadas. No grupo geoprópolis

observamos aderência tardia dos esferóides (apenas após 48 horas de cultivo), além de ocorrer de maneira parcial nesse grupo, ou seja, parte dos esferóides permaneceram suspensos mesmo após 72 horas de sua inserção em poços de placas aderentes (23,08% de adesão). Para o grupo combinado, nenhum dos esferóides aderiu durante o período observado e consequentemente, a área dos mesmos permaneceu estável ao longo das 72 horas (Figura 9C).

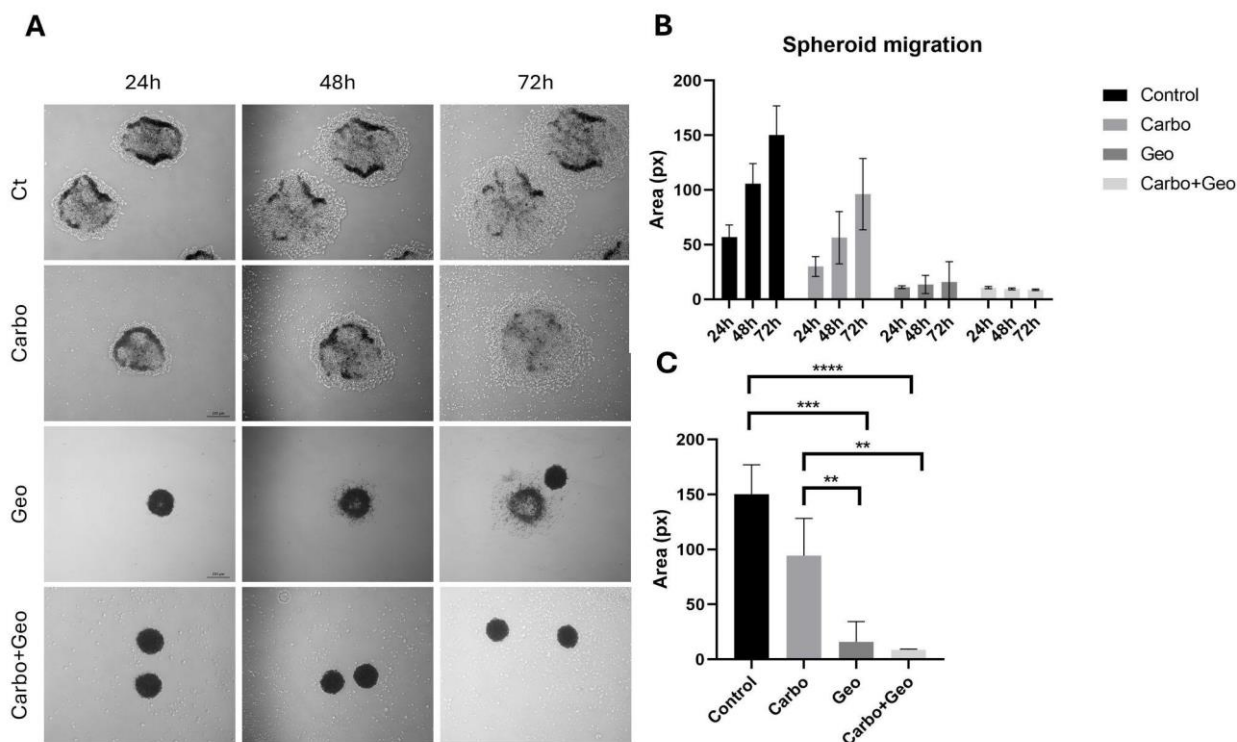


Figura 10: Análise da migração de esferóides de células SKOV-3. Esferóides formados e estabilizados por seis dias plaqueados em placas de 6 poços. **A)** Adesão e crescimento dos esferóides após tratamento. **B)** Área de crescimento ao longo de 72 horas. **C)** Área de migração após 72h.

5.9 Análise da proliferação, citoesqueleto, junções celulares e reparo de DNA em esferóides de OVCAR-8 tratados com carboplatina e geoprópolis

A caracterização morfológica e funcional dos esferóides de OVCAR-8 foi realizada por imunofluorescência após 5 dias de tratamento com carboplatina (25 μ M), geoprópolis (340 μ g) ou sua combinação (Figura 10A). A coloração com DAPI (azul) permitiu a visualização dos núcleos celulares, enquanto a faloidina (rosa) marcou a organização do citoesqueleto de actina, e o marcador Ki-67 (vermelho) foi utilizado para detectar células em proliferação. Nos esferóides controle, observou-se morfologia esferoidal íntegra com intensa marcação nuclear e distribuição homogênea da actina cortical. O marcador Ki-67 foi detectado, indicando atividade proliferativa.

Apesar do tratamento combinado alcançar redução significativa na viabilidade (Figura 4), os esferóides não apresentaram evidência morfológica de desintegração ou falta de integridade esferoidal. A presença de Ki-67 predominantemente na periferia, como observado em todos os grupos, indica que a proliferação celular não foi inibida de forma acentuada, conforme padrão previamente descrito em modelos 3D.

A expressão persistente de Rad51 nos esferóides tratados com geoprópolis (Figura 10B) reforça a manutenção da atividade de reparo de DNA, sugerindo que o dano promovido pelo composto natural não é severo o suficiente para bloquear a replicação ou induzir resposta genotóxica robusta.

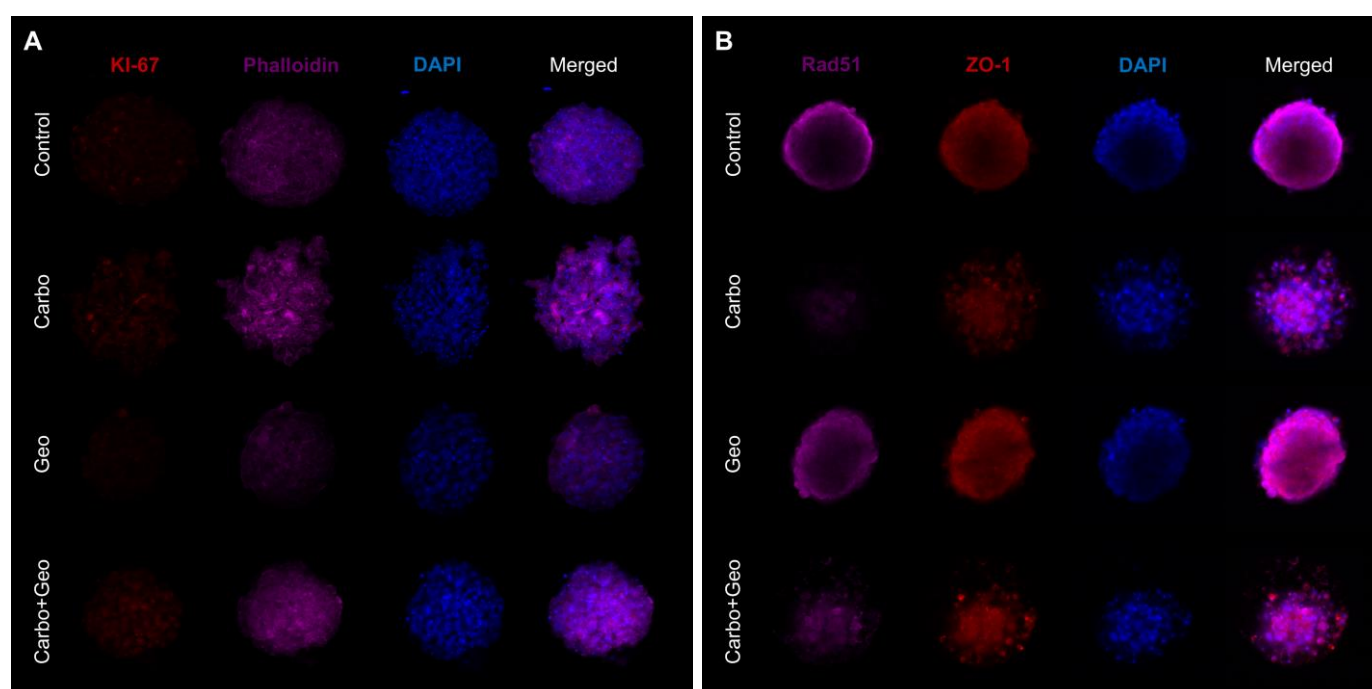


Figura 11: Análise por imunofluorescência de esferóides de OVCAR-8 tratados com carboplatina (25 μ M), geoprópolis (340 μ g) ou combinação por 5 dias. **A)** marcação para Ki-67 (vermelho), faloidina (roxo), DAPI (azul) e sobreposição (Merged). **B)** Rad51 (roxo), ZO-1 (vermelho), DAPI (azul) e sobreposição (Merged).

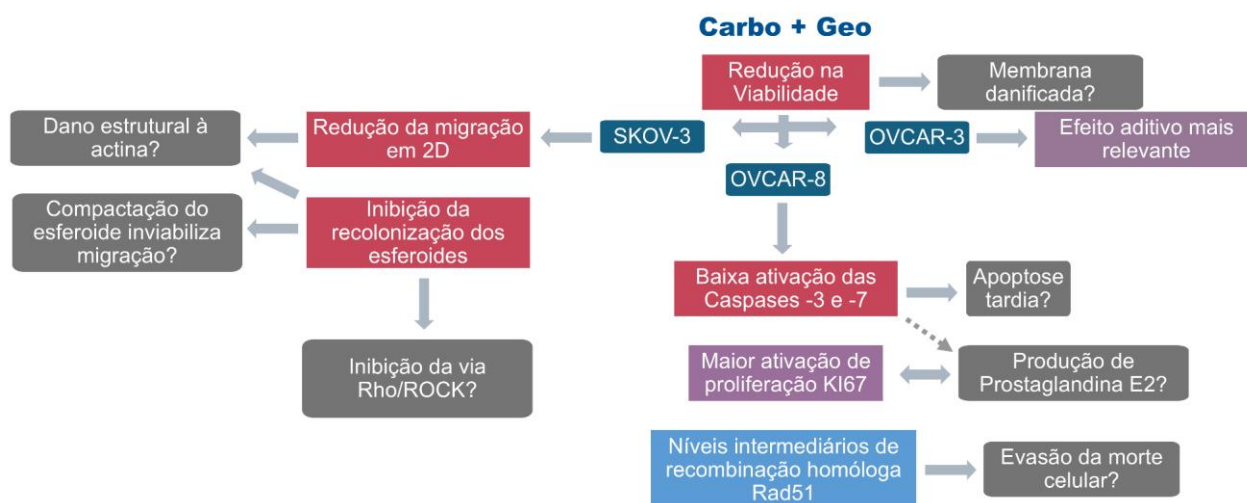


Figura 12: Esquema apresentando os principais achados científicos deste projeto de pesquisa.

6. DISCUSSÃO

Os nossos achados revelaram que a administração de geoprópolis sozinha alterou importantes vias da sobrevivência celular, reduzindo a viabilidade das três linhagens neoplásicas estudadas, de maneira seletiva, ou seja, sem afetar negativamente a viabilidade de células representativas normais. A partir da combinação entre carboplatina e geoprópolis, observamos redução mais significativa da viabilidade celular, redução na migração celular, bem como redução na migração de células sobreviventes dos esferóides. Contraditoriamente, também observamos baixo sinal de ativação das Caspases -3 e -7, maior ativação de proliferação em KI-67 e níveis intermediários de Rad51 comparado ao controle - marcador de recombinação homóloga.

A seguir, os resultados serão discutidos divididos em blocos, relacionando importantes atividades celulares com o processo de progressão tumoral.

Citotoxicidade e efeito aditivo

A análise de viabilidade celular nos esferóides das linhagens SKOV-3, OVCAR-3 e OVCAR-8 demonstrou que a geoprópolis apresentou atividade citotóxica relevante quando administrada isoladamente, e ainda mais acentuada quando em combinação com a carboplatina. Notavelmente, a geoprópolis induziu citotoxicidade de forma independente, sugerindo que seus compostos bioativos atuam por mecanismos distintos da carboplatina (Wang, 2005), o que pode justificar o efeito aditivo observado na combinação pela análise de interação.

Curiosamente, embora as células OVCAR-3 sejam conhecidamente resistentes à



cisplatina (Hamilton, 1983), necessitando também de maiores doses de carboplatina, foi a linhagem que apresentou melhor resposta à geopropolis isolada, em uma dose comparativamente menor entre as linhagens estudadas. Para a linhagem OVCAR-8 observamos intenso dano à integridade celular, evidenciado pela modificação estrutural nos esferóides e viabilidade menor que 50% no grupo combinado. Também é relevante notar que, nesse grupo, houve certo nível de dissociação do esferóide à medida que as células mais externas e expostas recebiam diretamente o efeito do tratamento. Um ponto interessante a se ressaltar, foi que esses mesmos esferóides não apresentaram fluorescência quando incubados com *ethidium homodimer-1* (dados não mostrados), enquanto quando incubadas com Iodeto de propídio (PI), claramente pudemos observar morte celular e alterações morfológicas. Essa discrepância sugere que as células tratadas podem estar passando por uma desestabilização progressiva da membrana, onde, embora ambos reagentes sejam utilizados para marcação de morte celular, apenas o PI foi capaz de detectar dada a sua maior permeabilidade (Thermo Fisher Scientific, 2025). Esses achados apontam para um estágio de apoptose tardia ou pré-necrótico que pode não ser imediatamente evidente com os marcadores de morte mais conservadores (Rieger, 2010). Essa hipótese ganha corpo quando avaliamos também outra marcação fluorescente, dessa vez para as Caspases -3 e -7, marcadores de apoptose, onde, embora o grupo combinado tenha apresentado grande dano celular, a fluorescência dessas caspases permaneceu em um nível muito próximo ao basal visto no controle.

Proliferação e reparo

A expressão de KI-67 é esperada na superfície dos esferóides, uma vez que a própria conformação prevê a formação de zonas de proliferação, senescência e necrótica (da região mais externa para a mais interna) (Caleffi, 2021). É esperado para as células tumorais atividade proliferativa mais acentuada e, no presente trabalho, observamos expressão de KI-67 mais evidente nos esferóides tratados com carboplatina comparados ao controle. Interessantemente, essa expressão foi diminuída na administração da geopropolis isolada, mas retomada na administração da combinação, evento este que pode ser decorrente de uma proliferação compensatória, tomando em consideração o efeito observado na morfologia e diminuição acentuada na viabilidade deste grupo. Nesse mecanismo, células sobreviventes aumentam a sinalização de proliferação em uma tentativa de substituir as células danificadas e recuperar a homeostase do tecido (Haynie, 1977; Ryoo, 2012; Friedman, 2016; Diwanji, 2018).

De encontro à hipótese da proliferação compensatória, vimos que nos esferóides



tratados com a combinação, a organização estrutural do esferóide, através da marcação com faloidina, aparentou estrutura mais compacta e densa devido à proliferação concomitante à morte celular. Ainda na combinação, como já discutido, a atividade das Caspases -3 e -7 aparece reduzida em comparação ao grupo tratado apenas com carboplatina. Inibidores de caspases como IAPs e c-FLIP são frequentemente superexpressos em células tumorais. Nesses casos, a perda ou inibição da Caspase -3 pode não apenas conferir resistência à apoptose promovida pela quimioterapia, como também células tumorais remanescentes podem emitir mitógenos e assim acentuar o crescimento tumoral (Ryoo, 2012). A via de morte celular extrínseca CD95/Fas/Apo-1 também parece estar envolvida, onde CD95 recruta FADD e Caspase-8 e consequente ativação da Caspase-3. Nessa investigação, a via extrínseca da apoptose não parece ter sido ativada, uma vez que tivemos baixa marcação das Caspases -3 e -7. CD95, por outro lado, também pode promover proliferação mediada por JNK, Fos, e Egr1, o qual foi também reportado em câncer de ovário (Chen, 2010). A atividade proliferativa da Caspase-3 é mediada por fosfolipase citosólica independente de cálcio A2 (iPLA2), que produz prostaglandina E2 (Li, 2010, Ryoo, 2012).

A detecção robusta de Rad51 no grupo tratado com geoprópolis com intensidade semelhante à do controle sugere que a via de reparo por recombinação homóloga não foi significativamente inibida. Esta via é um mecanismo essencial que as células usam para quebras de dupla fita no DNA, garantindo a estabilidade genômica (Wright, 2018). Como é de amplo conhecimento, a carboplatina age formando adutos no DNA intra ou interfita, que impedem a progressão das DNA polimerases levando à parada do ciclo celular e morte (Kelland, 2007). Células com alta atividade de Rad51 são geralmente resistentes a esse mecanismo de ação da platina. Curiosamente, apesar de OVCAR-8 ser amplamente resistente à platina (Schilder, 1990), houve baixa expressão de Rad51 após o tempo de exposição determinado comparada ao controle, ao contrário do que era esperado. Esse evento pode ocorrer em situações onde a morte celular é mais rápida que a detecção da enzima, entretanto, nos níveis de morte celular observados, deveria haver expressão. Outro ponto a ser questionado é o fato de que na combinação, onde temos maior taxa de morte celular, a atividade de Rad51 aparece em níveis intermediários comparado ao controle. Tomados em conjunto os dados de viabilidade e reparo do DNA, entendemos que a geoprópolis isolada promove citotoxicidade, a qual melhora o efeito da carboplatina na combinação, mas não afeta diretamente a atividade Rad51.

Adesão e Migração



Dado que a geoprópolis não inviabilizou completamente a sobrevivência dos esferóides tumorais, nós decidimos investigar como as células remanescentes seriam capazes de repovoar novos sítios. Seguindo o mesmo padrão de resposta visto nos ensaio de viabilidade, o grupo de esferóides tratado com carboplatina aderiu parcialmente, o que possivelmente está ligado ao dano causado nos filamentos de actina - visto também na marcação fluorescente com faloidina - apresentando certo grau de desorganização estrutural. Quando avaliamos esse efeito nos esferóides tratados com geoprópolis vimos que, além da adesão acontecer mais tardiamente, a migração das células ocorreu de maneira lenta e gradual, comparada ao controle e à carboplatina. Dutra (2014) caracterizou a geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão da espécie por *Melipona Fasciculata* Smith descrevendo-a como predominante em ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, com destaque para os ácidos gálico e elágico. Estudo prévio mostrou que o ácido gálico foi capaz de promover modificações na morfologia celular de SKOV-3 e OVCAR-3 (50 e 94 µg/mL), principalmente nas moléculas de actina - acumulação de actina polimerizada e diminuição de prolongamentos de membrana, e tubulina no citoesqueleto - acúmulo de tubulina estabilizada e aumento no número de microtúbulos, além de paralisação do ciclo celular, morte celular por indução de apoptose e geração de ROS (Varela-Rodriguez, 2020). Em nosso estudo vimos baixa marcação fluorescente para filamentos de actina no grupo tratado com geoprópolis isolada, o que pode ser característico da redução da actina polimerizada, levando a baixa detecção. No grupo tratado com a combinação, nenhum esferóide foi capaz de aderir novamente, ou recolonizar novo sítio, mesmo após reestabelecidas as condições ideais de cultivo. Esse efeito pode ter ocorrido devido à duas hipóteses: I) Células com citoesqueleto danificado perdem ou têm sua capacidade de migração reduzida (Zhang, 2020); II) Os eventos de reorganização estrutural do esferóide provocaram compactação do mesmo, alta adesão intercelular, inviabilizando a migração. Apesar de se tratar de migração a partir dos esferóides, esse processo de desprendimento na migração acontece célula-célula, ou em um grupo de células (Weiswald, 2015; Nath, 2016). A partir disso, inferimos que o processo de migração a partir desse grupo de células segue a mesma lógica de migração já conhecida para a interação célula-célula. Notavelmente a interação célula-matriz é diferenciada, uma vez que em monocamada, as células sofrem maior influência das integrinas na forma de adesão focal, podossomos, etc., enquanto em 3D, essa movimentação é regulada por outros fatores como a família de pequenas GTPases Rho (envolvida na migração amebóide) e proteases (metaloproteinases de matriz) (Treat, 2012). A família de Rho tem sido amplamente explorada como alvo terapêutico devido ao seu envolvimento no contexto migratório e invasivo no câncer



(Guo, 2015; Zubor, 2020). Assim, acreditamos que, ao menos em parte, o efeito anti migratório observado possa decorrer da atividade de inibição da via Rho/ROCK promovida pelo tratamento combinado. Esse efeito não se restringe aos esferóides, pois quando avaliamos a capacidade migratória dessas mesmas células cultivadas em monocamada e expostas aos tratamentos, o padrão se repete. Apesar de não se notar diferença significativa entre carboplatina e geoprópolis, quando levamos em consideração o quimioterápico isolado e a combinação, o segundo se mostrou mais eficiente na redução da migração celular. Esses dados sugerem que a geoprópolis, isoladamente ou em combinação com a carboplatina, possui efeito antimigratório sobre células tumorais de CO, o que pode estar associado à inibição de processos relacionados à progressão tumoral e metástase.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que a geoprópolis apresenta efeito citotóxico seletivo em células tumorais de ovário, cultivadas em modelo bi e tridimensional, acentuando o impacto do quimioterápico carboplatina quando em combinação. Além da redução da viabilidade celular, a associação dos compostos promoveu prejuízo à migração e adesão celular, sugerindo potencial contenção de mecanismos relacionados à progressão e disseminação tumoral. Curiosamente, a baixa ativação de caspases, somada a persistência de marcadores de proliferação celular, e presença intermediária de Rad51 podem indicar o envolvimento de vias de morte alternativas.

O presente estudo amplia o conhecimento sobre o potencial terapêutico da geoprópolis associada à carboplatina como agente adjuvante no tratamento de neoplasias ovarianas. No entanto, reconhecemos limitações dos resultados, como a ausência de ensaios moleculares para contestar as vias moleculares apontadas na migração e morte celular não apoptóticas. Futuramente será importante investigar se a geoprópolis atua diretamente sobre componentes das vias Rho, IAPs ou sinalização não canônica de CD95 (via proliferativa), além da caracterização dos sub compostos envolvidos nessas funções.



REFERÊNCIAS

- ABREU, B. V. B. et al. Quantificação de polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túbu) coletado no cerrado maranhense. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 8, p. 18–24, 2006.
- CALEFFI, J. T. et al. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. **Life Sciences**, v. 286, p. 120028, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.120028.
- CHEN, L. et al. CD95 promotes tumour growth. **Nature**, v. 465, n. 7297, p. 492–496, 2010. DOI: 10.1038/nature09075.
- DIWANJI, N.; BERGMANN, A. An unexpected friend – ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 74–82, 2018. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.004.
- DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 12, p. 2549–2557, 26 mar. 2014. DOI: 10.1021/jf404875v. PMID: 24571707.
- DUTRA, R. P. et al. Pharmacognostic evaluation of geopropolis of *Melipona fasciculata* Smith from Baixada Maranhense, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557–562, 2008.
- FRIEDMAN, R. Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation. **Oncotarget**, v. 7, n. 11, p. 11746–11755, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.7459.
- GUO, Y. et al. A novel pharmacologic activity of ketorolac for therapeutic benefit in ovarian cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 22, p. 5064–5072, 2015. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0461.
- HAMILTON, T. C. et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. **Cancer Research**, v. 43, n. 11, p. 5379–5389, 1983.
- HAYNIE, J. L.; BRYANT, P. J. The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. **Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 183, p. 85–100, 1977. DOI: 10.1007/BF00848779.
- LI, F. et al. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. **Science Signaling**, v. 3, n. 110, ra13, 2010. DOI: 10.1126/scisignal.2000634.
- KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 573–584, 2007. DOI: 10.1038/nrc2167.
- NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 163, p. 94–108, 2016. DOI:



10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.

RIEGER, A. M. et al. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 358, n. 1–2, p. 81–92, 2010. DOI: 10.1016/j.jim.2010.03.019.

RYOO, H. D.; BERGMANN, A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 8, a008797, 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a008797.

SCHILDER, R. J. et al. Metallothionein gene expression and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 45, p. 416–422, 1990. DOI: 10.1002/ijc.2910450306.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Viability and Cytotoxicity Assay Reagents—Section 15.2. Ethidium and Propidium Dyes. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/assays-for-cell-viability-proliferation-and-function/viability-and-cytotoxicity-assay-reagents.html>. Acesso em: 16 jun. 2025.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell migration. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 4, p. 2369–2392, 2012. DOI: 10.1002/cphy.c110012.

VARELA-RODRÍGUEZ, L. et al. Effect of gallic acid and myricetin on ovarian cancer models: A possible alternative antitumoral treatment. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, p. 110, 2020. DOI: 10.1186/s12906-020-02900-z.

WANG, D.; LIPPARD, S. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 307–320, 2005. DOI: 10.1038/nrd1691.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1016/j.neo.2014.12.004.

WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W. D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10524–10535, 2018. DOI: 10.1074/jbc.TM117.000374.

ZHANG, P.; TENG, J.; WANG, L. Multiwalled carbon nanotubes inhibit cell migration and invasion by destroying actin cytoskeleton via mitochondrial dysfunction in ovarian cancer cells. **Aging** (Albany NY), v. 12, n. 24, p. 25294–25303, 2020. DOI: 10.18632/aging.104130.

ZUBOR, P. et al. Rho GTPases in gynecologic cancers: In-depth analysis toward the paradigm change from reactive to predictive, preventive, and personalized medical approach benefiting the patient and healthcare. **Cancers** (Basel), v. 12, n. 5, p. 1292, 2020. DOI: 10.3390/cancers12051292.

9. Material Suplementar

9.1 Co-cultura OVCAR-8 e células NK expostas à geoprópolis

Células OVCAR-8 marcadas com GFP foram co-cultivadas com células NK em meio contendo geoprópolis (340µg/mL) ou meio de crescimento convencional em dispositivo de microfluídica. Os esferóides foram fotografados em microscópio invertido de fluorescência a cada 8 horas e a viabilidade dos esferóides foi quantificada (Figura suplementar 1).

Ao longo do período observado, a geoprópolis não mostrou influência sobre o perfil de resposta das células NK sobre os esferóides de câncer de ovário. Esse padrão foi observado através da fluorescência de GFP que se manteve a mesma na presença ou ausência de geoprópolis.

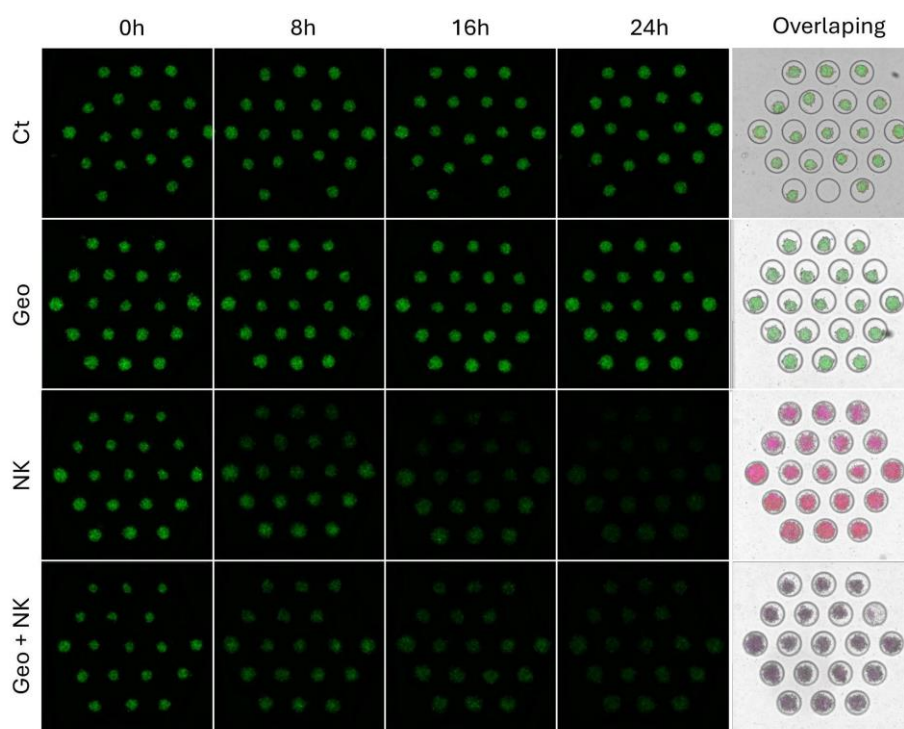


Figura suplementar 1: Co-cultura de esferóides de OvcAR-8 e células NK expostas à Geo.



Capítulo II

Treinamento técnico

Fabricação de dispositivos de microfluídica: desenvolvimento da técnica e aplicação utilizando células tumorais ovarianas

O Capítulo II apresenta a descrição da principal técnica desenvolvida - Fabricação, desenvolvimento e aplicação de dispositivos de microfluídica - em seus mínimos detalhes e etapas, durante o estágio de 12 meses Capes PRINT - PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INTERNACIONALIZAÇÃO, na instituição internacional MAYO CLINIC - MEDICAL SCHOOL, ROCHESTER/MN - USA.

Orientador internacional: Dr. Alexander Revzin



1. Fabricação dos dispositivos de microfluídica

O cultivo em modelo tridimensional aproxima a fisiologia e o microambiente das células *in vitro* com aquele encontrado em humanos *in vivo*, fazendo com que os resultados sejam mais robustos (Fontana et al., 2020). A microfluídica tem se destacado em aplicações como cultura celular, separação de células e ensaios celulares, por oferecer controle preciso de pequenos volumes, maior rapidez nas análises, alto rendimento e automação flexível (Mehling & Tay, 2014). Esses sistemas (Fig. 1) possibilitam a criação de microambientes celulares estáveis e controláveis, adequados para o cultivo de diferentes tipos de células e estudos utilizando plataformas microfluídicas têm revelado novas informações sobre estruturas e comportamentos celulares (Tazana et al., 2015). Comparadas aos métodos convencionais, as culturas celulares em microfluídica consomem menos reagentes, permitem fornecimento contínuo de nutrientes e remoção eficiente de resíduos, além de reduzirem o tempo e o custo das análises (Mehling & Tay, 2014).

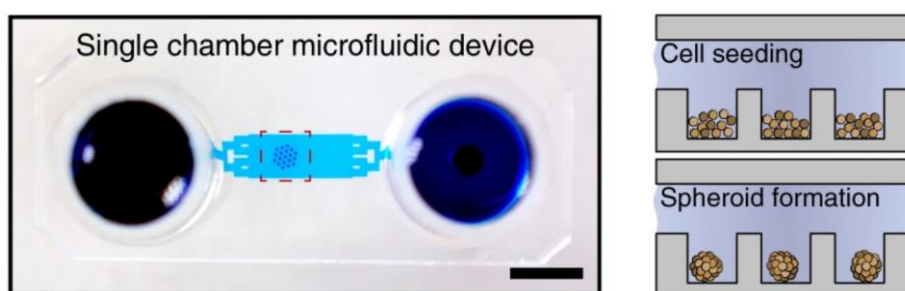


Figura 1: Dispositivo de microfluídica à direita e ilustração da sedimentação celular e formação dos esferóides em cada micropoço do sistema. Adaptado de Dadgar et al., 2020

A fabricação dos moldes se dá por fotolitografia, técnica que utiliza a radiação ultravioleta (UV) para sensibilizar uma resina fotossensível. A seguir, serão apresentados os principais passos para a fabricação dos dispositivos de microfluídica, assim como os cuidados que devem ser empregados (Choi et al., 2024; Dadgar et al., 2020).

Critical step: Limpar a bancada com isopropanol para remover vestígios do material PDMS (Polímero de polidimetilsiloxano).

Após a fabricação dos moldes, é possível reutilizá-los por tempo indeterminado enquanto se mantêm sem aderência e com as estruturas preservadas. Se notar que o PDMS está aderindo aos moldes, repetir a etapa de sinalização.

1| Realizar a mistura de PDMS e agente de polimerização de acordo com a proporção desejada, (no modelo de dispositivo utilizado no projeto, a proporção foi de 10:1) e levar para o Misturador Planetário Centrífugo. Esse equipamento faz a mistura de líquidos de alta viscosidade sem a formação de bolhas de ar. Após os dois ciclos de mistura, adiciona-se o PDMS+agente de polimerização aos moldes (Fig. 2).

Critical step: Manter a atenção na proporção dos volumes, a proporção incorreta pode afetar a capacidade de polimerização do PDMS, bem como a porosidade e consequente permeabilidade e flexibilidade.

2| Distribuição do PDMS + agente polimerização nos moldes. Ao adicionar a mistura nos moldes, pode ser que se formem bolhas entre o molde e o líquido, assim como no meio do próprio líquido. Para remover, colocar a placa no dessecador a vácuo de 15 a 30 minutos.

Critical step: Não ultrapassar 1 hora no dessecador, ou o PDMS pode começar a polimerizar desnivelado.

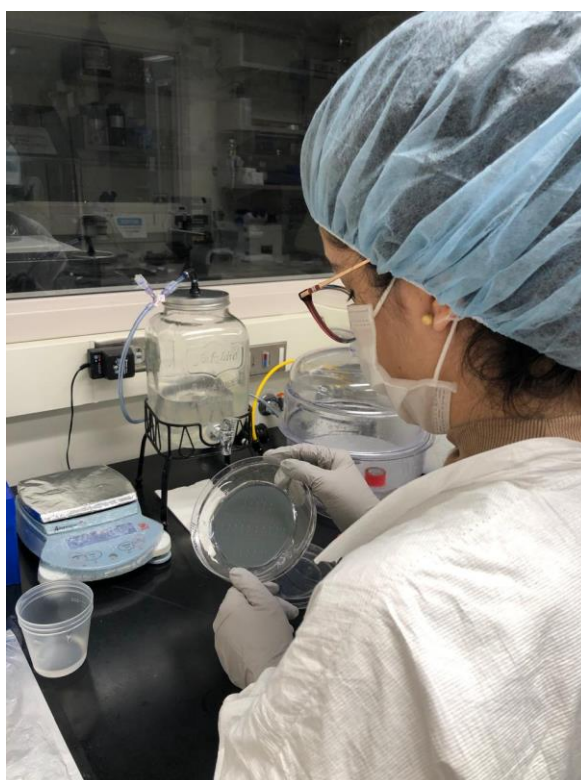


Figura 2: PDMS sendo acrescentado nos moldes. Arquivo pessoal.

3| Após a etapa de degaseificação, deixar as placas e uma superfície nivelada por 10 minutos para garantir a formação de uma camada homogênea (Fig. 3).

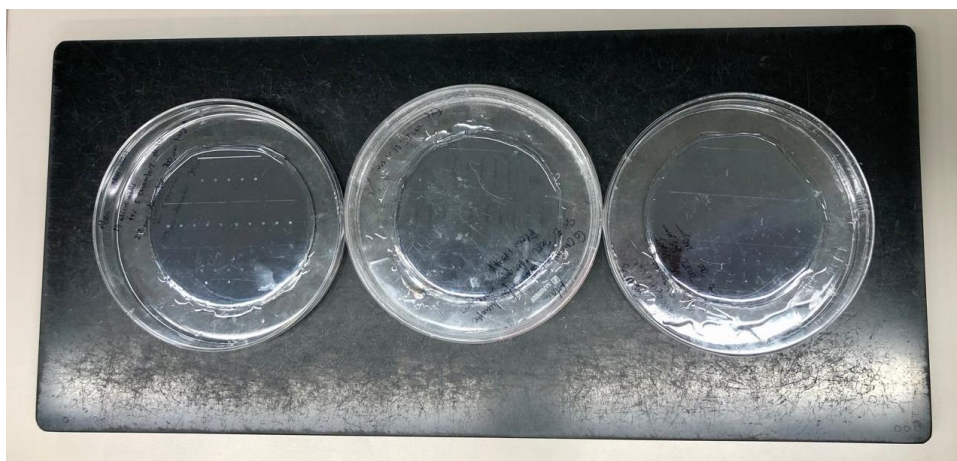


Figura 3: PDMS estabilizando para formar uma camada homogênea sobre uma bancada nivelada. Arquivo pessoal.

4| Levar a placa para o forno por uma hora para a polimerização do PDMS.

Critical step: Não deixar no forno por muito mais tempo, pois pode danificar as estruturas. A medida que o PDMS polimeriza, ele contrai, dessa forma se mantido por muito tempo em altas temperaturas, a contração pode impedir que as estruturas se soltem do PDMS e dessa forma alterem o molde.

5| Uma vez polimerizado, utilizar um estilete para cortar o entorno dos moldes, apenas para destacar o PDMS, liberando um “bloco” contendo quatro unidades (Fig. 4).

Critical step: Tomar o cuidado de cortar apenas o contorno do molde, sem danificar as estruturas principais.

Critical step II: Não cortar muito mais que o contorno do molde para que ele não se solte, pois uma vez solto, pode ser que fique desnivelado com PDMS entrando por baixo do molde.

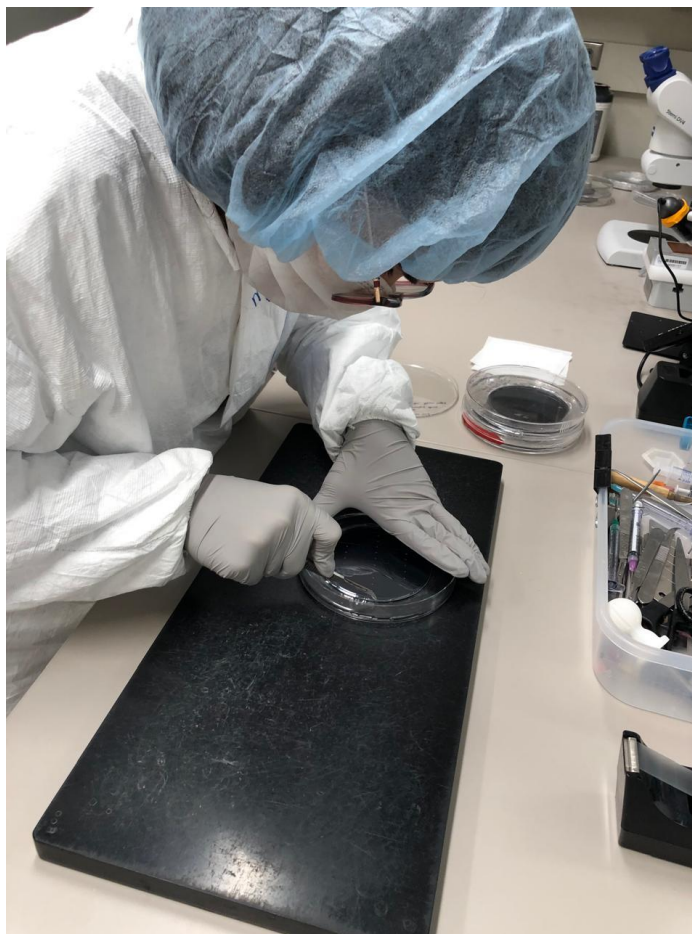


Figura 4: Retirada do PDMS polimerizado dos moldes após o tempo de forno. Arquivo pessoal.

6| Separar as unidades do “bloco” de PDMS (Fig. 5). Esse modelo de dispositivo é composto por duas camadas, uma para a formação dos canais por onde circula o meio de cultura e outra para a formação dos poços onde os esferoides celulares se desenvolvem. Para a individualização das unidades, o processo é o mesmo, seja para a camada dos canais, seja para a camada dos poços. Entretanto, após individualizados, na camada dos canais, é preciso utilizar um perfurador para abrir o canal por onde o meio irá passar no dispositivo pronto.

Critical step: Após furar com o perfurador, retirar a ponta de PDMS que ficou no furo, caso essa etapa não seja realizada corretamente, o fluxo não acontecerá apropriadamente e o dispositivo será inutilizado.

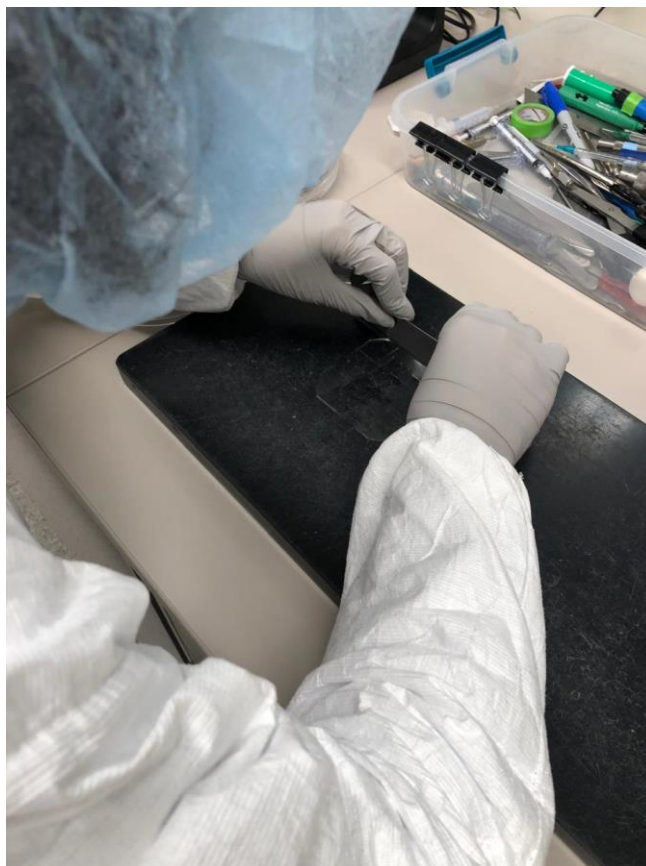


Figura 5: Individualização das unidades (quatro por molde). Arquivo pessoal.

7| Montar os dispositivos unindo as camadas. O dispositivo utilizado é composto por duas camadas, de modo a formar os poços e os canais condutores de meio e células. Cada uma das camadas foi gerada a partir de um molde diferente e ambas seguiram as mesmas etapas descritas anteriormente, com exceção do uso do perfurador, que é exclusivo aos canais. A junção das camadas se dá por cura do agente de polimerização, onde fazemos uma fina e uniforme camada de agente de polimerização e embebemos a camada superior (dos canais), unindo em seguida com a camada inferior (dos poços) de modo que ambas as cavidades se encontrem, formando a estrutura poço mais canais condutores.

8| Adicionar os cilindros reservatórios de meio. Uma vez que as camadas estão unidas, adicionamos os cilindros que servirão como reservatórios para o meio de crescimento e tratamentos em futuros experimentos. Para isso, utilizamos a mesma mistura 10:1 de PDMS e agente de polimerização para uni-los ao dispositivo. Após posicionar os cilindros com PDMS, os dispositivos precisam ser polimerizados no forno novamente por no mínimo 30 minutos.

Critical step: Nessa etapa é necessário ter atenção para não formar bolhas de PDMS entre o cilindro e a abertura do dispositivo, pois uma vez que a bolha se rompa, o PDMS ainda líquido pode escorrer e obstruir a entrada do dispositivo, inutilizando-o.

9| Remover as bolhas do interior dos dispositivos. PDMS é ar-permeável, o que é necessário para o cultivo celular, entretanto, permite formação de bolhas, as quais precisam ser removidas antes de iniciar o plaqueamento ou esses bolsões de ar podem obstruir a passagem de células e meio de cultura. Para isso, circulamos PBS pelo dispositivo, seguindo de vácuo por 20 minutos e descanso de 1 hora na geladeira. Essa etapa irá “puxar” as bolhas para os cilindros, que serão removidas quando realizar a troca de soluções.

2. Plaqueamento celular nos dispositivos

Antes de realizar o plaqueamento, os dispositivos precisam passar por uma etapa de preparação. Essa preparação é feita adicionando Pluronic® para impedir a aderência das células e esterilização na UV.

10| Trocar o PBS pelo Pluronic®. Substituir o PBS dos cilindros por Pluronic, e logo em seguida criar pressão através da diferença de volume entre os cilindros (aproximadamente 15µl). Essa pressão irá “empurrar” o PBS de dentro do dispositivo e substituir por Pluronic®. Finalizada a troca, colocar os dispositivos na UV por 1 hora.

Critical step: não tentar aspirar completamente os volumes, a troca deverá acontecer apenas pela diferença de volume dos cilindros. A tentativa de remoção poderá criar bolhas novamente, obrigando a voltar ao passo anterior.

11| Após uma hora, lavar os dispositivos com PBS novamente. Para isso, utilize a mesma técnica adotada nas trocas de soluções anteriores (criando uma diferença de volume). Após lavar os dispositivos, iniciar o plaqueamento.

12| Destaque as células da placa de cultura como de costume e quantifique. Para a linhagem celular Ovar-8, utilizada para o plaqueamento nesses dispositivos (Fig. 6), é sugerido fazer uma solução na concentração de 2×10^6 células por mL. Plaquear as células criando um fluxo de meio através da pressão hidrostática exercida pela diferença de volume entre os dois cilindros opostos.

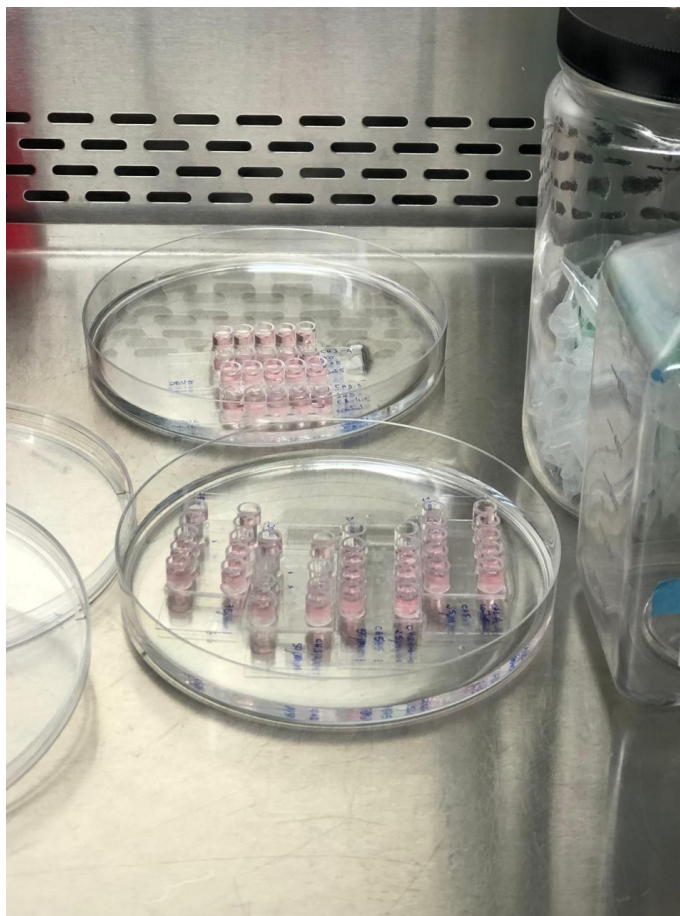


Figura 6: Dispositivos prontos preenchidos por meio de cultura. Arquivo pessoal.

3. Referências Bibliográficas

- CHOI, D. et al. Microfluidic organoid cultures derived from pancreatic cancer biopsies for personalized testing of chemotherapy and immunotherapy. **Advanced Science** (Weinh), v. 11, n. 5, e2303088, 2024. DOI: 10.1002/advs.202303088.
- DADGAR, N. et al. A microfluidic platform for cultivating ovarian cancer spheroids and testing their responses to chemotherapies. **Microsystems & Nanoengineering**, v. 6, p. 93, 2020. DOI: 10.1038/s41378-020-00201-6.
- FONTANA, F. et al. Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6806, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186806.
- MEHLING, M.; TAY, S. Microfluidic cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 95–102, 2014. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.10.005.
- TAZAWA, H. et al. A microfluidic cell culture system for monitoring of sequential changes in endothelial cells after heat stress. **Thrombosis Research**, v. 136, n. 2, p. 328–334, 2015. DOI: 10.1016/j.thromres.2015.05.008.



Biografia do autor

3. Formação:

- *Doutorado em Biologia Geral e Aplicada (2021 – atual)*

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Título: Atividade Antitumoral da Geoprópolis em Associação à Carboplatina em Células Tumoriais Ovarianas.

Orientadora: Flávia Karina Delella | Co-orientadores: Luiz Gustavo A. Chuffa e José Maurício Sforcin.

- *Mestrado em Biologia Geral e Aplicada (2019 – 2021)*

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Título: Efeito do Ácido Anacárdico com Paclitaxel em Células Tumoriais Ovarianas.

Orientadora: Flávia Karina Delella

- *Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura) (2014 – 2017)*

Universidade Paulista (UNIP)

4. Experiência profissional:

- *Doutorado Sanduíche (10/2023 – 09/2024)*

Mayo Clinic Rochester – EUA – Department of Physiology and Biomedical Engineering

Supervisor: Alexander Revzin

5. Disciplina cursadas durante o doutorado (2021-2023):

Disciplinas Cursadas	Conceito	Carga Horária	Créditos
Aprendizado de Máquina em Python	A	60	4
Imunomodulação por produtos naturais	A	90	6
Programação em Python	A	60	4
Biologia Celular	A	45	3
Métodos de Estudo em Biologia Celular e Molecular	A	75	5
Noções básicas e aplicações da bioinformática	A	45	3
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada	A	30	2
Análises Estatística no R e suas Aplicações nas Diversas Áreas de Conhecimento	B	60	4
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Saúde Mental na Pós-Graduação: Espaço de Reconhecimento e Troca	A	15	1
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada	A	30	2
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Plataforma do Currículo Lattes/CNPq – Atualização	A	15	1
Tópicos Especiais em Biometria: Introdução à Bioestatística no Programa R	A	30	2
Total		555	37

6. Artigos Científicos Publicados:

1. Caleffi JT, **Aal MCE**, Gallindo HOM, Caxali GH, Crulhas BP, Ribeiro AO, Souza GR, Delella FK. Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. Life Sci. 2021 Dec 1;286:120028. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120028.
2. Martinucci B, Cuciolo MS, Minatel BC, Cury SS, Caxali GH, **Aal MCE**, Felisbino SL, Pinhal D, Carvalho RF, Delella FK. Fibronectin Modulates the Expression of miRNAs in Prostate Cancer Cell Lines. Front Vet Sci. 2022 Jul 11;9:879997. doi: 10.3389/fvets.2022.879997.
3. Nunes HC, Tavares SC, Garcia HV, Cuciolo MS, Dos Santos SAA, **Aal MCE**, de Golim MA, Justulin LA Jr, Ribeiro AO, Deffune E, Scarano WR, Delella FK. Bisphenol A and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin at non-cytotoxic doses alter the differentiation potential and cell function of rat adipose-stem cells. Environ Toxicol. 2022 Sep;37(9):2314-2323. doi: 10.1002/tox.23598.
4. Caxali GH, Brugnertotto L, **Aal MCE**, Castro CFB, Delella FK. Identification of Biomarkers Related to the Efficacy of Radiotherapy in Pancreatic Cancer. Cancer Genomics Proteomics. 2023 Sep-Oct;20(5):487-499. doi: 10.21873/cgp.20400.
5. Débora S M de Sousa, Gabrielle P M Monari, Cassiana F da Rosa, Jacques F Meis, Ana



Flavia M Pereira, Tatiane B Zapata, Cauê B T dos Santos, Mirian C E Aal, Flavia K Delella, Sandra M G Bosco, Ary F Júnior, Márcia S C Melhem, Eloisa F Clemente, Bruna B C Mendonça, Bruno C Rossini, Lucilene D dos Santos, Luciana S Ruiz, Natural products eugenol and cinnamaldehyde as potential therapeutic alternatives against *Candida auris* infections, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 136, Issue 8, August 2025, lxaf197, <https://doi.org/10.1093/jambio/lxaf197>

7. Artigos Científicos Submetidos:

1. Gabriel Henrique Caxali, **Mirian Carolini Esgoti Aal**, Catherine Wesselka Garcia Osvaldo, Jakeline Santos Oliveira, Lucas Tadeu Bidinotto, Robson Francisco Carvalho, Flávia Karina Delella. Integrating the Secretome and Interactome to Identify Novel Biomarkers and Therapeutic Targets in Colorectal Cancer. Submetido ao periódico *Cell Communication and Signaling* em 26/03/2025, *under review*.
2. **Mirian Carolini Esgoti Aal**, Juliana Trindade Caleffi, Gabriel Henrique Caxali, Andressa Souza de Oliveira, Luiz Antonio Soares Romeiro, Flávia Karina Delella. Anacardic Acid Enhances Paclitaxel Cytotoxicity in Ovarian Cancer: Insights into Metabolic Pathways and Gene Targets. Submetido ao periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology* em 12/05/2025, *under review*.