

Análise da atividade anticarcinogênica da Bacarina em melanoma induzido experimentalmente

Autores: Gabriel Henrique Gastaldello¹⁽¹⁾, Cristiane Tefé-Silva¹⁽²⁾

Colaboradores: Vanessa Leiria Campo¹, Karina Furlani Zoccal¹

¹Centro Universitário Barão de Mauá

⁽¹⁾*gabrielhenriquegastaldello@gmail.com*, ⁽²⁾*cristiane.silva@baraodemaua.br*

Resumo

O melanoma é uma neoplasia com alta taxa de agressividade e letalidade. Neste estudo, investigamos os efeitos da Bacarina, isolada da própolis verde, sobre o melanoma. A atividade antitumoral foi avaliada através do tratamento em camundongos com células B16F10. Como resultado, a Bacarina reduziu a angiogênese e alterou o número de macrófagos, sugerindo uma ação favorável sobre a progressão e desenvolvimento tumoral.

Introdução

Estima-se que, no Brasil, aproximadamente 33% dos diagnósticos de câncer referem-se às neoplasias de pele. Esse número corresponde a 180 mil novos casos registrados por ano (INCA, 2018). Nesse cenário, o tumor cutâneo de maior relevância é o melanoma, considerado o tipo com pior prognóstico e mais agressivo (BONO *et al.*, 1999). Descrito em 1806 por René Laënnac, o melanoma maligno cutâneo baseia-se na transformação atípica dos melanócitos, células produtoras de melanina presentes na camada basal da epiderme, expandindo-se às camadas profundas e superficiais (IRANZO *et al.*, 2015). A princípio, a etiologia desse tipo de câncer esta relacionada a fatores ambientais, genéticos e do hospedeiro, como idade e pele clara (ABBAS e KUMAR, 2010; TUCKER e GOLDSTEIN, 2003). Ademais, este possui ampla capacidade de produzir metástases linfáticas e hematógenas, responsáveis pelo alto grau de mortalidade (IRANZO *et al.*, 2015). Durante o ano de 2016, ocorreram 1.773 óbitos pela doença no país, resultando em uma taxa de mortalidade ajustada pela população mundial de 0,66 por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Além do elevado índice metastático, o melanoma possui alta agressividade em estágios mais avançados, o que diminui a efetividade das terapias atuais: remoção cirúrgica, radioterapia, crioterapia e quimioterapia, empregadas de forma

isolada ou em combinação (BONO *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2010; COUSSENS e WERB, 2002). Nesse cenário, um dos principais aspectos negativos da quimioterapia são seus graves efeitos adversos e formação de resistência a múltiplas drogas (CHINEMBIRI *et al.*, 2014). Alinhadas a essas desvantagens, pesquisas centradas na medicina alternativa oferecem um grande potencial de inovação terapêutica. Em suma, as plantas medicinais representam uma fonte notável de compostos para o tratamento de diversas doenças (YANG *et al.*, 2016). Inúmeros compostos fitoquímicos originados de plantas e extratos naturais têm apresentado resultados antitumorais relevantes, gerando um cenário favorável para o desenvolvimento de novas terapias (CHINEMBIRI *et al.*, 2014).

Conhecida popularmente como Alecrim do campo e vassourinha, a planta *Baccharis dracunculifolia*, nativa das regiões brasileiras Sul, Sudeste e Centro-Oeste, serve de substrato para a elaboração da própolis verde. A própolis possui inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas, sendo utilizada desde a Antiguidade. No Brasil, é difundida na medicina popular para o tratamento da tuberculose, úlcera duodenal, distúrbios gástricos, febre e como agente anestésico, anticancerígeno e antimicrobiano (SALATINO *et al.*, 2005). Após a descoberta da *B. dracunculifolia* como principal fonte botânica da própolis verde, conforme relatado no trabalho de Bankova *et al.* (1999), muitas pesquisas continuam sendo realizadas, demonstrando grande interesse por essa espécie vegetal. Entre as propriedades estudadas, destaca-se sua capacidade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, antiviral e anticarcinogênica (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2014; ALENCAR *et al.*, 2005).

No campo da oncologia, pesquisas com esses compostos apresentaram atividade farmacológica significativa frente a inúmeros tipos de câncer (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2014). A própolis possui notável citotoxicidade para diversas células tumorais, tais como células de fibrossarcoma humano (HT-1080) e células de adenocarcinoma

do pulmão humano (A549) (BANSKOTA *et al.*, 2002). Na análise experimental de Akao *et al.* (2003), os extratos Bacarina e Drupamina, derivados do ácido cinâmico presente na própolis verde e *B. dracunculifolia*, apresentaram atividade antitumoral *in vitro* sobre células de leucemia mielocítica humana (HL60), possivelmente devido a indução da apoptose.

Neste estudo, observamos uma modulação significativa no número de células inflamatórias recrutadas para a região tumoral. Também houve uma redução relevante na quantidade de vasos sanguíneos na área neoplásica. Em síntese, esses resultados indicam um potencial anticarcinogênico promissor a ser explorado para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

Objetivos

O presente estudo tem como objetivo geral a avaliação da capacidade antitumoral presente no composto ativo Bacarina, extraído da própolis verde, em resposta ao melanoma B16F10 induzido experimentalmente em camundongos. Dentre os objetivos específicos, inclui-se a avaliação do perfil histopatológico dos fragmentos obtidos, observando as características das lesões (tamanho e ulcerações) e análise morfométrica (quantificação de vasos sanguíneos e identificação de células inflamatórias), bem como a taxa de sobrevivência dos camundongos durante a realização do experimento.

Métodos

Preparação do composto Bacarina

O composto isolado Bacarina foi cedido pela Profa. Dra Vanessa Leiria Campo, em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP. A princípio, para obtenção do extrato, 1 kg de própolis verde (fornecida por Apis Flora Ltda) foram congeladas, pulverizadas em moinho de facas e subsequentemente submetidas a maceração em solução hidroalcoólica 7:3, seguida de percolação durante 3 dias, por três vezes consecutivas. A solução hidroalcoólica foi filtrada e evaporada em rotaevaporador e liofilizada. O extrato obtido foi posteriormente submetido tanto à cromatografia líquida a vácuo (CLV), quanto à cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC – High Speed counter Chromatography). Frações obtidas foram reunidas e purificadas em sistema preparativo CLAE-UV (Shimadzu), com uso de coluna preparativa C8 (Shimadzu Shim-pack prep.-ODS) e sistema de eluição por gradiente MeOH/água, fornecendo ao final cerca de 0,5 gramas de

Bacarina pura. O composto foi suspenso em 997 µL de PBS 1x (tampão de solução salina fosfato) e 3µL de DMSO (dimetilsulfóxido) – concentração final de 1mg/mL.

Animais

Camundongos da linhagem Balb/C machos e fêmeas (6-8 semanas de idade) de aproximadamente 20 gramas foram obtidos a partir do biotério do Centro Universitário Barão de Mauá (São Paulo, Brasil). Os animais utilizados no experimento foram mantidos a 25 °C, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, com livre acesso a água e alimentos. Todos os experimentos foram previamente aprovados e conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal do Centro Universitário Barão de Mauá (processo 346/19).

Cultura de células

As células de melanoma da linhagem B16F10 foram cultivadas em meio de cultura e, uma vez confluentes, exibindo uma fase de crescimento exponencial, foram ajustadas para a concentração de 10⁶ células/ml em solução salina a 0,1% de meio DMEN incompleto (*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*).

Ensaio Experimental

A priori, os animais (n=22) utilizados no experimento foram divididos em quatro grupos. Sendo estes:

- GRUPO 1 - Controle: recebeu apenas o veículo de diluição do composto (PBS v.o.)
- GRUPO 2 - PBS+Bacarina: Injeção de PBS + tratamento com o composto Bacarina v.o.
- GRUPO 3 - Melanoma: Injeção de células B16F10 + PBS v.o.
- Grupo 4 - Melanoma+Bacarina: Injeção de células B16F10 + tratamento com composto Bacarina v.o.;

Em seguida, os camundongos tiveram sua região dorsal tricomizada com auxílio de um barbeador Panasonic (aproximadamente 1,5 cm de diâmetro). No primeiro dia de experimento, os camundongos pertencentes ao grupo Melanoma (n=7) e Melanoma+Bacarina (n=6) foram inoculados com células B16F10 em concentração 10⁶ células/0,1 ml em solução tampão salina fosfato (PBS) a 0,9% na região subcutânea dorsal. Os grupos Controle (n=4) e Bacarina (n=5) receberam solução tampão salina fosfato (PBS) a 0,9% na região subcutânea dorsal. Após a inoculação do tumor, os grupos tratados Melanoma+Bacarina e Bacarina ingeriram via gavagem o composto Bacarina (500 µg/kg v.o) durante 26 dias. Os grupos Controle e Melanoma receberam PBS (1 mL v.o.) contendo a mesma

quantidade de álcool presente na solução do composto, durante 26 dias, por meio de gavagem (Figura 1). Durante a realização do experimento, a sobrevivência foi monitorada. Os animais ao final do tratamento foram sacrificados após 30 dias da inoculação do tumor em câmara de CO₂.

FIGURA 1 – Esquema representativo dos dias de tratamento dos animais.



Fonte: próprio autor.

Avaliação da lesão

Para medir as dimensões do tumor (em mm³), foi utilizado um paquímetro. Resumidamente, volume do tumor = (comprimento x altura x largura) / 2. Para isso, as medidas foram realizadas a cada 3 dias, durante todo o experimento.

Análise histológica e morfométrica

As amostras tumorais foram coletadas com tecido adjacente para preservar o microambiente e fixadas em uma solução de formaldeído a 10%. Em seguida, foram desidratadas com álcool etílico em série crescente (70%, 80%, 90% e 100%). O processo de diafanização utilizou como reagente o Xilol. Blocos de parafina foram preparados, seccionados (4 µm) e corados com hematoxilina e eosina (HE).

Para análise morfométrica foi utilizado um microscópio Nikon eclipse E200 acoplado a uma câmera de vídeo (Tucsen USB 2.0 H Series). Os vasos tumorais primários foram quantificados em ampliação de 40x em 15 campos aleatórios de microscopia não coincidentes. As células inflamatórias (Macrófagos e Neutrófilos) foram quantificadas em ampliação de 400x em 15 campos aleatórios de microscopia não coincidentes. Para isso, foi utilizado o programa ISC, Tucsen Photonics Co., Ltd.

Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas dos dados obtidos, utilizou-se o software GraphPad v 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. A diferença entre dois grupos foi avaliada usando o teste t Student. Para comparação de vários grupos, realizamos a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste post-

hoc de Tukey. Valores de p <0,05 foram considerados significativos.

Resultados e discussão

Por meio deste estudo, analisamos a progressão de células de melanoma B1610 em camundongos e como a administração via oral de Bacarina influenciou o desenvolvimento de fatores envolvidos no microambiente tumoral. O modelo de indução neoplásico com células B16F10 em camundongos é amplamente utilizado. A transformação de melanócitos normais em células neoplásicas ocorre pela ação de um retrovírus derivado de B16 (LI *et al.*, 1998). A linhagem F10 do melanoma B16 possui grande potencial metastático e alta agressividade (SILVA *et al.*, 2013).

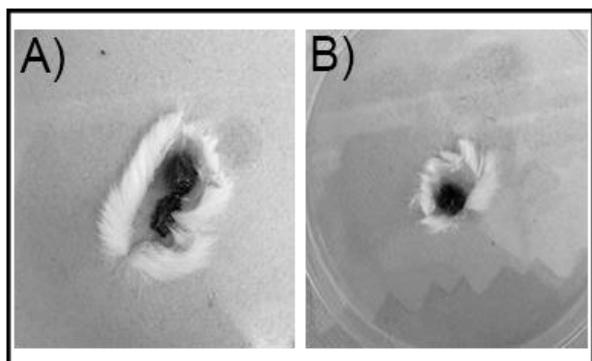
Atualmente, nosso grupo de pesquisas vem demonstrando evidências promissoras acerca das propriedades terapêuticas de extratos naturais. Nascimento *et al.* (2019) observaram resultados favoráveis em modelo experimental de inflamação aguda e progressão tumoral com o extrato da planta *Arctium lappa*. Segundo Garcia *et al.* (2020, no prelo), o extrato hidroalcoólico de *Lobelia inflata* contém compostos com atividade antitumoral significativa contra o melanoma.

A respeito da atividade contra células tumorais do extrato da *B. dracunculifolia*, diversos estudos apontam evidências promissoras. Um dos compostos constituintes mais investigados em relação a sua atividade antitumoral é o cafeato de feniletino, entretanto, outros compostos fenólicos e diterpenoides também apresentam atividade (BANSKOTA *et al.*, 2001). Para Akao *et al.* (2003), os derivados do ácido cinâmico da própolis verde e *B. dracunculifolia*, como a Bacarina e Drupanina possivelmente induzem a apoptose sobre células de leucemia mielocítica humana (HL60).

Crescimento tumoral e monitoramento dos camundongos

Os camundongos da linhagem Balb/C tiveram o crescimento tumoral monitorado por 28 dias após a injeção das células B16F10. Nesse período, 6 medições acerca do volume (mm³) foram obtidas através da utilização de um paquímetro. Ao final do experimento, as regiões que apresentaram crescimento tumoral e acúmulo de melanina foram extraídas e analisadas (Figura 2). No entanto, os valores não apresentaram diferença entre médias do teste ANOVA e Turkey de múltiplas comparações. Em relação à taxa de sobrevivência dos animais, não houve diferença significativa durante a realização do experimento entre os grupos, tendo em vista que não houve mortes em nenhum grupo no período.

Figura 2 – Figura representativa da análise do tamanho do tumor. A) Lesão tumoral de animal do grupo não tratado (Melanoma); B) Lesão tumoral em animal tratado com Bacarina (Melanoma+Bacarina)



Fonte: próprio autor.

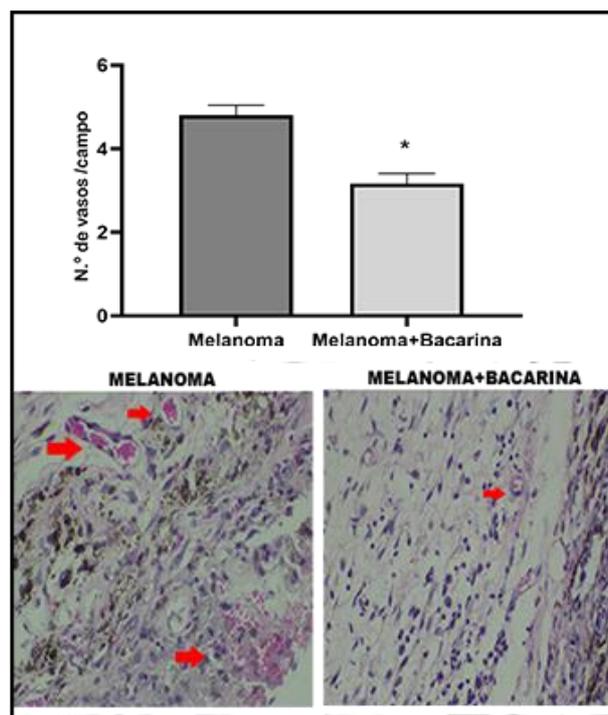
Análise da Bacarina sobre vasos sanguíneos

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos. Embora seja um processo normal de crescimento e cura, também está ligada ao desenvolvimento de inúmeras doenças, incluindo o câncer. Com isso, constitui-se como um passo importante para a progressão e invasão do tumor, possibilitando que as células cancerígenas se estabeleçam no sítio-alvo e mantenham um crescimento contínuo (POLLARD, 2008). Esse processo é promovido pela expressão aprimorada de fatores endógenos angiogênicos, como Interleucina-8 (IL-8) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que levam a um maior aumento na formação de vasos (RISAU, 1997). As células de melanoma produzem citocinas e fatores de crescimento, alguns dos quais possuem atividade angiogênica potente (ESQUIVEL-VELÁZQUEZ *et al.*, 2015). Tendo isso em vista, a capacidade invasiva é assegurada por nutrientes, remoção de citotoxinas e oxigênio (POLLARD, 2008).

Em relação aos animais pertencentes ao grupo Melanoma, à média de vasos por campo ($4,8 \pm 0,347$) observada através da microscopia óptica foi maior quando comparada aos animais do grupo Melanoma+Bacarina ($3,1 \pm 0,347$). Com isso, houve uma diferença significativa entre a formação de vasos dos grupos, evidenciando um impacto do tratamento com Bacarina sobre a angiogênese tumoral (Figura 3).

Figura 3 – Figura representativa da análise quantitativa de vasos sanguíneos. A Bacarina reduz a quantidade de vasos sanguíneos da região tumoral. Comparação entre o grupo Melanoma ($n=7$) que ingeriu apenas PBS (1 mL v.o.), substância veículo de diluição do composto, e o grupo Melanoma+Bacarina ($n=6$) que recebeu tratamento com o composto Bacarina (500 µg/Kg v.o.) durante 26 dias. *As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,0001$ de

acordo com teste t *Student* e ANOVA. Abaixo, imagem representativa do corte histológico de vasos sanguíneos em aumento de 200x.



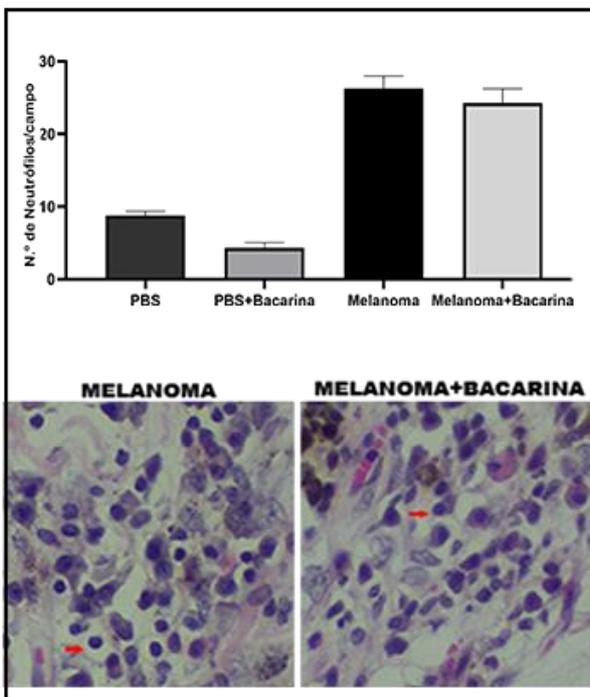
Fonte: próprio autor.

Análise da Bacarina sob o processo inflamatório

A inflamação é um processo envolvido na patogênese e progressão de diversas doenças. Habitualmente, a reação inflamatória busca restaurar a homeostase afetada por uma lesão ou infecção. No desenvolvimento tumoral, o processo imune é um componente fundamental (MEDZHITOV, 2008). Portanto, buscamos determinar a quantidade de células inflamatórias presentes no fragmento cutâneo da lesão.

As células tumorais induziram um aumento expressivo na quantidade de neutrófilos recrutados para a região observada nos campos de microscopia óptica dos fragmentos histológicos (Figura 4). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos Melanoma ($26,3 \pm 0,57$) e os animais pertencentes ao grupo Melanoma+Bacarina ($24,9 \pm 0,57$) (Figura 4).

Figura 4 – Figura representativa da análise quantitativa de neutrófilos. O tumor induz um aumento de neutrófilos. Comparação entre os grupos Controle ($n=4$), Melanoma ($n=7$) que ingeriram apenas PBS (1 mL v.o.), substância veículo de diluição do composto, e os grupos Bacarina ($n=5$) e Melanoma+Bacarina ($n=6$) que receberam tratamento com o composto Bacarina (500 µg/Kg v.o.) durante 26 dias. Abaixo, imagem representativa do corte histológico de neutrófilos em aumento de 200x.

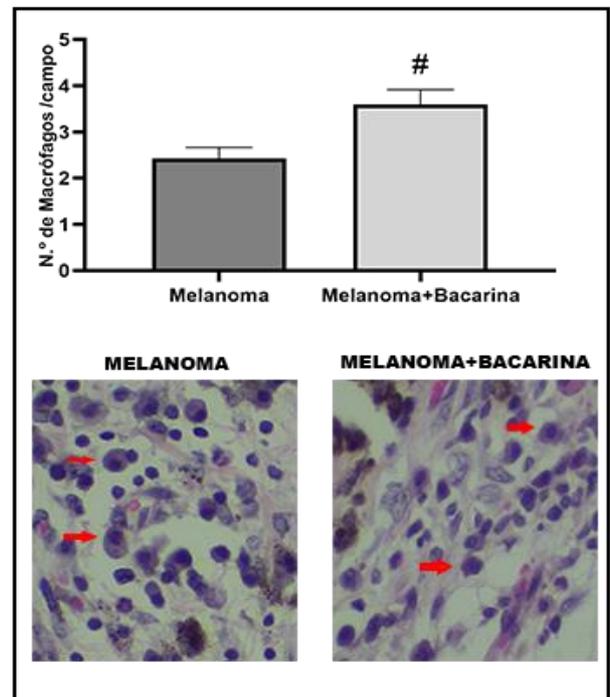


Fonte: próprio autor.

Os oxidantes podem causar danos teciduais associados à inflamação. No entanto, sua produção é um importante mecanismo da resposta imune, pois conferem uma via microbicida dos macrófagos. Com base nessa informação, achados sugerem fortemente a ação ativadora do extrato e compostos isolados de *B. Dracunculifolia* e própolis verde sobre macrófagos e sua consequente liberação de H_2O_2 (MISSIMA *et al.*, 2007). Quando ativados por uma combinação de fatores, a exemplo alterações metabólicas e citocinas, os macrófagos podem matar células tumorais específicas. Em certas circunstâncias, macrófagos podem apresentar antígenos associados a tumor (AAT) nas células T e estimular a resposta imunitária específica do tumor. AAT são porções de moléculas intracelulares expressas na superfície celular como parte do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) (SNYDER *et al.*, 2014). Em nosso experimento, observamos que a média de macrófagos observadas por campo no grupo melanoma ($2,42 \pm 0,39$) foi consideravelmente menor em relação ao grupo Melanoma+Bacarina ($3,59 \pm 0,39$). Nesse sentido, o tratamento com o composto Bacarina está provavelmente associado ao aumento dessas células inflamatórias no sítio tumoral (Figura 5).

Figura 5 – Figura representativa da análise quantitativa de macrófagos do tumor. A Bacarina eleva a quantidade de Macrófagos recrutados para a região tumoral. Comparação entre o grupo Melanoma (n=7) que ingeriu apenas PBS (1 mL v.o.), substância veículo de diluição do composto,

e o grupo Melanoma+Bacarina (n=6) que recebeu tratamento com o composto Bacarina (500 µg/Kg v.o.) durante 26 dias. #As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$ de acordo com o teste t de student e teste ANOVA. Abaixo, figura representativa do corte histológico de macrófagos, em aumento de 200x.



Fonte: próprio autor.

Conclusões

O tratamento para o melanoma maligno cutâneo é extremamente desafiador. Neste estudo, confirmamos que a Bacarina, substância isolada extraída da própolis verde, apresenta ação robusta sobre determinados fatores que contribuem para o crescimento e progressão tumoral, como a angiogênese e atividade modulatória sobre macrófagos. Vale ressaltar que fornecemos uma evidência a cerca de sua atividade em camundongos. No entanto, estudos futuros são necessários para delimitar seu efeito terapêutico a partir da compreensão de seu mecanismo de ação.

Referências

ABBAS, A.K., FAUSTO, N, KUMAR, V. **Robbins & Cotran - Patologia** - Bases Patológicas das Doenças 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

AKAO, Yukihiro; MARUYAMA, Hiroe; MATSUMOTO, Kenji; OHGUCHI, Kenji; NISHIZAWA, Kumi; SAKAMOTO, Takashi; ARAKI, Yoko; MISHIMA, Satoshi; NOZAWA, Yoshinori. Cell Growth Inhibitory Effect of Cinnamic Acid Derivatives from Propolis on Human Tumor Cell Lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.1057-1059, 2003.

ALENCAR, Severino Matias de; AGUIAR, Cláudio Lima de; PAREDES-GUZMÁN, Julio; PARK, Yong Kun. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.909-915, ago. 2005.

BANKOVA, Vassya. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 100, n. 1-2, p.114-117, ago. 2005.

BANKOVA, Vassya. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.29-32, 2005.

BONO, Aldo; TOMATIS, Stefano; BARTOLI, Cesare; TRAGNI, Gabrina; RADAELLI, Giovanni; MAURICHI, Andrea; MARCHESINI, Renato. The ABCD system of melanoma detection. **Cancer**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.72-77, 1 jan. 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921976>. Acesso em: 11 out. 2019.

CHINEMBIRI, Tawona; DUPLESSIS, Lissinda; GERBER, Minja; HAMMAN, Josias; DUPLESSIS, Jeanetta. Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment. **Molecules**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.11679-11721, 6 ago. 2014.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, [s.l.], v. 420, n. 6917, p.860-867, dez. 2002.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, Marcela et al. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.1-16, jan. 2015.

FUKUDA, M. et al. Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v.54, p.1465-8, 2006.

GARCIA, Nathalia Prata et al. Antitumoral Effect of *Lobelia inflata* in An Experimental Mouse Model

of Melanoma. **Biomedical**, [s.l.], p. 18856-18864, 30 jan. 2020. No prelo.

INCA. *Câncer de pele melanoma*. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma/profissional-de-saude>>. Acesso em: 25 mar. 2019.

IRANZO, Carmen Cabañés; LARUBIA-ORTÍ, José Enrique de; CASTILLO, Sandra Sancho; FIRMINO-CANHOTO, Joao. Lesões cutâneas malignas e pré-malignas: conhecimentos, hábitos e campanhas de prevenção solar. **Acta Paulista de Enfermagem**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.2-6, fev. 2015.

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N., MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**, 8 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2008.

LI, Mengfeng; XU, Fan; MULLER, Jacqueline; HEARING, Vincent J.; GORELIK, Elieser. Ecotropic C-type retrovirus of B16 melanoma and malignant transformation of normal melanocytes. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 76, n. 3, p.430-436, 4 maio 1998.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, [s.l.], v. 454, n. 7203, p.428-435, jul. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Informática do SUS. *Informações de saúde (TABNET)* [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2018 Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet>. Acesso em: 12 set. de 2019.

MISSIMA, Fabiane; SILVA FILHO, Ademar A. da; NUNES, Gladston A.; BUENO, Paula C. Pires; SOUSA, João Paulo B. de; BASTOS, Jairo K.; SFORCIN, Jose M.. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 59, n. 3, p.463-468, mar. 2007.

MORENO, María I. Nieva; ZAMPINI, Iris C.; ORDÓÑEZ, Roxana M.; JAIME, Gloria S.; VATTUONE, Marta A.; ISLA, María I.. Evaluation of the Cytotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, and Antimutagenicity of Propolis from Tucuman, Argentina. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 23, p.8957-8962, nov. 2005.

NASCIMENTO, Bruno A. C.; GARDINASSI, Luiz G.; SILVEIRA, Inaê M. G.; GALLUCCI, Marília G.; TOMÉ, Mariana A.; OLIVEIRA, Júlia Fernanda D.; MOREIRA, Mirella R. A.; MEIRELLES, Alyne F. G.; FACCIOLI, Lúcia H.; TEFÉ-SILVA, Cristiane. Arctium lappa Extract Suppresses Inflammation and Inhibits Melanoma Progression. **Medicines**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.81, 29 jul. 2019.

PEREIRA-FILHO, R. N.; BATISTA, F. S.; RIBEIRO, D. R.; MELO, G. C.; REIS, F. P.; MELO, A. U. C.; GOMES, M. Z.; CARDOSO, J. C. & ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Chemopreventive effect of Brazilian green propolis on experimental dermal carcinogenesis in murine model. **Int. J. Morphol.**, [s.l.], v.32, n. 2, p.522-530, 2014.

POLLARD, Jeffrey W.. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 84, n. 3, p.623-630, 8 maio 2008.

RISAU, Werner. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, [s.l.], v. 386, n. 6626, p.671-674, abr. 1997.

SALATINO, Antonio; TEIXEIRA, Érica Weinstein; NEGRI, Giuseppina; MESSAGE, Dejair. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.33-38, 2005.

SILVA, Cassio Fernando Nunes da et al. Modelos experimentais de melanoma murino in vivo Experimental models of in vivo murine melanoma. **Biosaúde**, Londrina, v. 15, n. 2, p.73-80, jul. 2013.

SNYDER, Alexandra; MAKAROV, Vladimir; MERGHOU, Taha; YUAN, Jianda; ZARETSKY, Jesse M.; DESRICARD, Alexis; WALSH, Logan A.; POSTOW, Michael A.; WONG, Phillip; HO, Teresa S.. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 371, n. 23, p.2189-2199, 4 dez. 2014.

TUCKER, Margaret; GOLDSTEIN, Alisa M. Melanoma etiology: where are we?. **Oncogene**, [s.l.], v. 22, n. 20, p.3042-3052, maio 2003.

YANG, Rui; YUAN, Bo-chuan; MA, Yong-sheng; ZHOU, Shan; LIU, Ying. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.5-18, 21 set. 2016.