

Análise da atividade da Artepelina C em modelo experimental de melanoma

Autores: Rafaela Tavares Mendes¹, Cristiane Tefé-Silva²

Colaboradores: Marianna M Vigo³, Karina F Zoccal³

^{1, 2, 3}Centro Universitário Barão de Mauá

¹rafaela.mendest150@gmail.com (Medicina), ²cristiane.silva@baraodemaua.br

Resumo

O melanoma é um tumor maligno agressivo considerado a neoplasia cutânea mais importante. Neste estudo, investigamos o comportamento tumoral do melanoma sob tratamento com o composto Artepelina C, em camundongos inoculados com células B16F10. Foi evidenciado que o composto não apresentou eficácia na redução da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral no melanoma.

Introdução

O melanoma é um tumor maligno agressivo considerado a neoplasia cutânea mais importante, sendo responsável pela maior causa de morte, representando 79% das mortes por câncer de pele e 0,7% de todas as mortes por câncer (DIMATOS *et al.*, 2009; SCHADENDORF *et al.*, 2018). Um paciente que morre por melanoma, perde em média 20 anos de vida potencial, além disso, nos Estados Unidos os custos para o tratamento do melanoma são de aproximadamente US\$ 3,3 bilhões por ano (GUY *et al.*, 2015), sendo assim o câncer é atualmente considerado um dos principais problemas de saúde pública do mundo (INCA, 2020).

O melanoma é derivado dos melanócitos, que estão localizados na porção basal da epiderme e são responsáveis pela produção do pigmento melanina (DAVIS *et al.*, 2019). Quando expostos à radiação ultravioleta, ocorre um acúmulo de mutações genéticas que ativam oncogenes e inativam genes supressores de tumor, dificultando e prejudicando o reparo do DNA (LINARES *et al.*, 2015). Com o aumento da incidência de melanoma nas últimas décadas, o diagnóstico precoce é importante, tendo em vista que quando diagnosticado precocemente tem excelente sobrevida a longo prazo (INCA, 2020). No entanto, o melanoma apresenta disseminação linfática muito precoce ao longo de sua evolução, sendo os linfonodos regionais o local mais frequente de metástases. Quando ocorrem, a presença de metástases piora muito o prognóstico do paciente, aqueles com metástases à distância apresentam sobrevida de 6 meses e o tratamento paliativo

(quimioterapia e radioterapia) para doença disseminada não aumenta a sobrevida (DIMATOS *et al.*, 2009). No estágio I, cujo tratamento padrão ouro é a excisão cirúrgica, tem sobrevida em 5 anos de 98%, enquanto na fase III essa sobrevida já está diminuída para 68%, necessitando de tratamento adjuvante posterior (SPAGNOLO *et al.*, 2019).

Caracteristicamente resistentes à quimioterapia e radioterapia convencional (FISCHER *et al.*, 2017), as opções terapêuticas são limitadas há muitos anos, fazendo com que várias terapias nos últimos trinta anos sejam testadas (RODRIGUES, 2021). Atualmente, vários medicamentos que vêm sendo utilizados na quimioterapia estão partindo de um protótipo natural. Os fitoterápicos têm se mostrado mais úteis no tratamento de determinadas patologias crônicas em relação à medicina moderna, apresentando menos efeitos colaterais e sendo mais econômicos (ÁLVAREZ, 2005). Entre os motivos apresentados pelos pacientes que defendem o uso de fitoterápicos e plantas medicinais estão a terapia do câncer, diminuição dos efeitos colaterais, melhoria do bem-estar e qualidade de vida, estimulantes do sistema imunológico e administração no cuidado da doença (VERHOEF *et al.* 2018).

Artepelina C é um composto fenólico prenilado presente em grandes quantidades na própolis verde. Devido a estrutura química de seus compostos, possui diversas atividades biológicas, algumas já descritas na literatura como: atividade citotóxica contra linhagem de células tumorais, anti-inflamatória, gastroprotetora, antiparasitária e antidiabética (ARRUDA, 2019; BERRETTA *et al.*, 2017). Com a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos eficazes para o melanoma e as diferentes atividades biológicas, incluindo seu potencial antitumoral, já observados a partir do Artepelina C, ficando evidente a relevância da pesquisa desse composto para uma nova opção terapêutica contra o melanoma. No presente experimento, analisamos o comportamento tumoral do melanoma sob tratamento com o composto Artepelina C, extraído da própolis verde, em camundongos inoculados com células B16F10.

Métodos

Preparação do composto Artepelina C

O composto isolado Artepelina C 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 conter current 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 Artepelina C. pura. O composto foi suspenso em 997 µL de PBS (Tampão salina fosfato) 1x 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 434/21).

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 (via oral))

-GRUPO 2 - PBS+Artepelina C: Injeção de PBS + tratamento com o composto Artepelina C, v.o.

-GRUPO 3 - Melanoma: Injeção de células B16F10 + PBS v.o.

-GRUPO 4 - Melanoma+Artepelina C: Injeção de células B16F10 + tratamento com composto Artepelina C 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+Artepelina C (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 Artepelina C (n=5) receberam solução PBS a 0,9% na região subcutânea dorsal. Após a inoculação do tumor, os grupos tratados Melanoma+Artepelina C e Artepelina C ingeriram via gavagem o composto Artepelina C. (500 µg/kg v.o) durante 28 dias. Os grupos Controle e Melanoma receberam PBS (1 mL v.o) contendo a mesma quantidade de álcool presente na solução do composto, durante 28 dias, por meio de gavagem. 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.

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

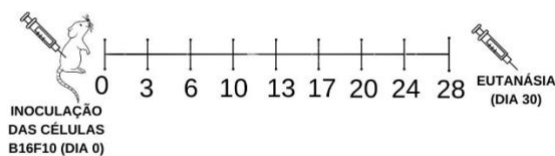
Para a realização das análises estatísticas dos dados obtidos, utilizou-se o software GraphPad v. 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média ± erro padrão da

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

A própolis é uma substância integrada pelas abelhas a partir de resina coletada de árvores e arbustos, combinada com cera e enzimas salivares (PIETTA *et al.*, 2002). Dependendo das plantas das quais a resina foi coletada, a própolis pode apresentar características diferentes, ou seja, sua composição está intimamente relacionada à flora de cada região geográfica. A própolis verde é proveniente do sudeste do Brasil, e a Artepelina C é um composto fenólico prenilado presente em grandes quantidades na mesma (COSTA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019; BARRETA *et al.*, 2017). Devido às suas diversas atividades biológicas demonstradas na literatura como anti-inflamatória, antigenotóxica e citotóxica contra células tumorais (ARRUDA, 2019). Neste estudo, analisamos o desenvolvimento tumoral induzido pelas células de melanoma B16F10 e a Artepelina C que é um composto presente na própolis verde, em relação aos seus efeitos na proliferação, angiogênese e inflamação no processo tumoral, através da indução do melanoma B16F10 em camundongos, e posterior tratamento com Artepelina C por 28 dias.

Figura 1 – Ilustração representativa dos dias de tratamento dos animais



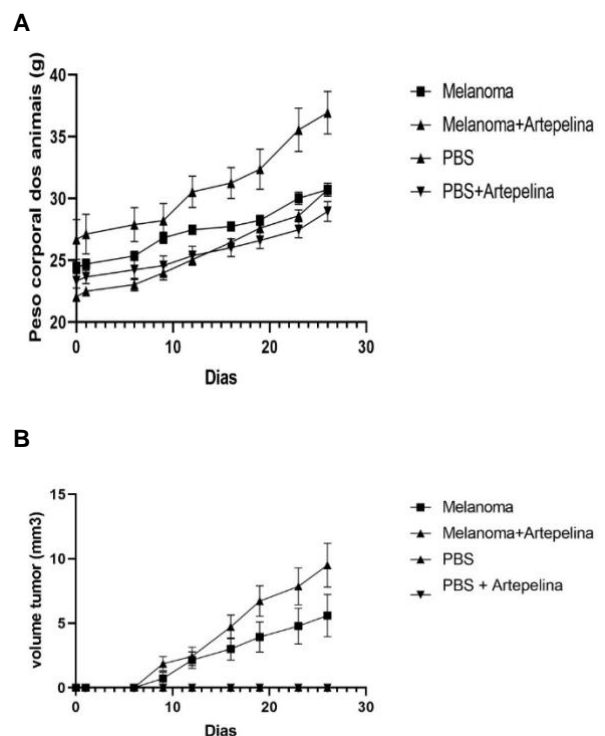
Fonte – imagem de autoria própria

Crescimento tumoral

No experimento após a injeção de células de melanoma B16F10, os camundongos foram monitorados por 28 dias. Durante este período, foram obtidas 9 medições do tamanho do tumor e 9 medições dos seus pesos. Ao final do experimento, as regiões onde houve crescimento tumoral foram extraídas para análise. No grupo tumor + Artepelina C, houve diferença significativa

em relação ao grupo tumor em relação ao crescimento tumoral, com o maior crescimento neste grupo mostrando que o composto não foi capaz de controlar o desenvolvimento tumoral e pode ter contribuído para o seu aumento.

Figura 2 - Figura representativa da análise do crescimento tumoral. A) Gráfico evidenciando diferença do ganho de peso dos animais em que foi inoculado tumor, mostrando maior ganho de peso devido ao maior crescimento tumoral nos animais tratados com a Artepelina C do que no grupo não tratado; B) Gráfico demonstrando diferença de volume tumoral, sendo maior o volume tumoral nos animais tratados com a Artepelina C do que no grupo dos não tratados.



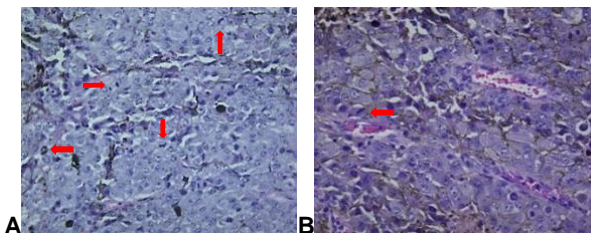
Fonte – imagem de autoria própria

Efeito da Artepelina C sobre as células mitóticas

Sabe-se que para uma célula evoluir do seu estado normal para assumir as características de uma célula neoplásica, é necessária uma série de mutações, envolvendo genes cuja ação está relacionada ao controle do ciclo celular. Se esta mutação ocorrer em oncogenes ou genes supressores de tumor, o resultado será a obtenção de uma célula com ganho proliferativo (maior número de mitoses). Considerando que as mitoses são fundamentais para o desenvolvimento do tumor, o número de mitoses que ocorreram no grupo tumor + Artepelina C e no grupo tumor foram analisados comparativamente. Para esta análise, a mitose foi quantificada por microscopia em 15 campos e em consequente com base nesta

quantificação foram geradas as estatísticas. Em relação à atividade mitótica, houve diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$ ($p=0,0416$) de acordo com o teste t de *Student* e ANOVA, com maior número de mitoses no grupo sem tratamento com composto ($0,5771 \pm 0,2812$). No entanto, durante a análise das lâminas, devido ao grupo tumor + Artepelina C, apresentar mais áreas de necrose e pigmento melanina, pode ter sido prejudicada a quantificação real do número de mitoses presentes nas lâminas deste grupo.

Figura 3 - Fotografia representativa das células mitóticas, imagem A representando grupo Melanoma (grupo 3) e imagem B grupo Melanoma + Artepelina C (grupo 4) (setas).

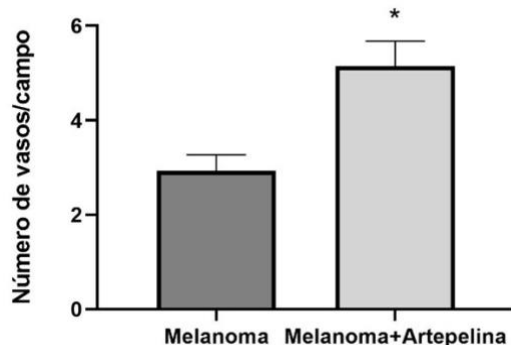


Fonte – imagem de autoria própria

Efeitos da Artepelina C sobre a angiogênese tumoral

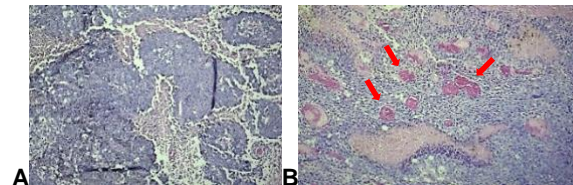
Mesmo que uma célula tenha um ganho proliferativo, isso por si só não é suficiente para que a célula sobreviva e dê origem a um tumor, para isso é necessário que haja também um suprimento sanguíneo, sendo iniciado assim a nível tumoral a formação de novos vasos, o que denominamos angiogênese. Em nosso estudo, quantificamos o número de vasos por microscopia óptica. Observou-se que o número de vasos foi maior no grupo tumor + Artepelina C em relação ao grupo tumor (3.357 ± 1.066), havendo diferença significativa de acordo com o teste t de *Student* e ANOVA com $p < 0,05$. Isso pode sugerir que a Artepelina C estimula a angiogênese.

Figura 4 - Gráfico representativo da análise comparativa da angiogênese no grupo melanoma em relação ao grupo melanoma + Artepelina C. Foi evidenciado que houve uma diferença significativa entre os grupos, sendo maior o número de vasos no grupo tratado. (*) $p < 0,05$.



Fonte – imagem de autoria própria

Figura 5 - Imagem representativa da análise da angiogênese dos grupos melanoma e melanoma + Artepelina C. Na imagem A representando o grupo melanoma (grupo 3) e a imagem B representando o grupo melanoma + Artepelina C (grupo 4), é possível perceber maior número de vasos no grupo 4 em relação ao 3 (setas).

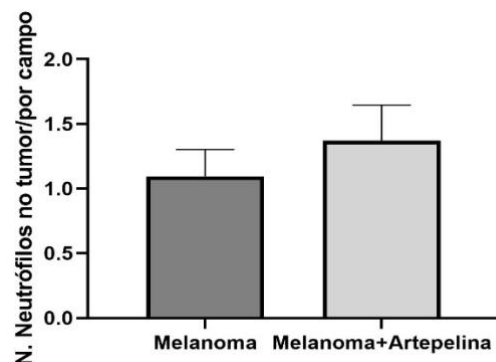


Fonte – imagem de autoria própria

Efeitos da Artepelina C na inflamação nas células tumorais

O tumor prejudica as células imunes presentes ao redor da lesão, levando ao enfraquecimento e desarmamento dessas. Isto é feito por meio da superprodução de fatores inflamatórios que visam desorientar as células de defesa, assim os glóbulos brancos e as células *natural killer* (NK) são neutralizadas, parando de lutar contra o tumor. Quanto mais o tumor cresce, mais ele induz a inflamação, que por sua vez estimula o crescimento. Assim, para nosso estudo, foi quantificado o número de neutrófilos e macrófagos presentes na amostra de tecido tumoral de camundongos. Ao comparar os grupos Tumor + Artepelina C e Tumor, não houve diferença significativa no recrutamento de células inflamatórias. Isso sugere que o composto Artepelina C não conseguiu reduzir a inflamação.

Figura 6 - Gráfico representativo da análise da inflamação nas células tumorais, evidenciando pela contagem de neutrófilos que não houve diferença significativa entre o grupo tratado e o não tratado.



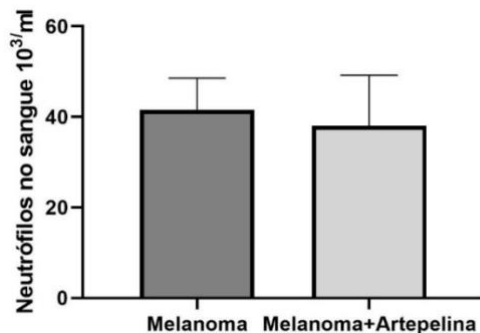
Fonte – imagem de autoria própria

Efeitos da Artepelina C na inflamação no sangue

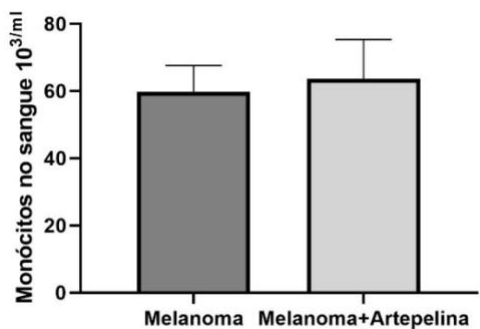
Como esperado, a análise de neutrófilos e macrófagos no sangue mostrou um maior número destes no sangue de animais injetados com melanoma. Porém, diferentemente do que esperávamos, não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar o grupo melanoma com o grupo melanoma + Artepelina C, evidenciando que o composto não foi capaz de reduzir a inflamação.

Figura 7 - Gráfico representativo da análise da inflamação no sangue, para esta análise foram quantificados os neutrófilos (mostrados no gráfico A) e os macrófagos (gráfico B) no sangue. Foi possível observar que não houve diferença significativa entre os grupos.

A



B



Fonte – imagem de autoria própria

Sabe-se que um dos efeitos positivos a serem considerados em uma terapia antineoplásica é o seu potencial pró-apoptótico (REED, 2000). A própolis verde leva à apoptose pela via intrínseca pela liberação do citocromo C da mitocôndria para o citosol, pela cascata das caspases e ativação das proteínas pró-apoptóticas: Bax, Bad, p53 e p21 (SAWICKA *et al.*, 2012). No entanto, de acordo com Sawicka (2012), o mecanismo de apoptose induzida pela própolis depende do tipo de compostos e da concentração do extrato. Além disso, estudos *in vitro* mostraram que existem diferentes sensibilidades a extratos em células tumorais associadas à ação apoptótica (ORSOLIC, 2003). Segundo Machado et al.

(2012), as atividades dos compostos da própolis dependem e variam de acordo com a interação entre os compostos, a concentração de cada um, sendo a explicação para os diferentes resultados encontrados em cada pesquisa. Nosso grupo de estudo, em pesquisas anteriores ao estudar outros compostos presentes na própolis verde como ácido p-cumárico e baccarina, demonstraram efeito antitumoral contra o melanoma B16F10 (GASTALDELLO *et al.*, 2021). Portanto, esperávamos encontrar resultados semelhantes com o Artepelina C. Mesmo com outros estudos indicando um possível efeito benéfico deste composto contra tumores, nossos resultados indicaram uma ineficácia e até um fator agravante no processo tumoral, portanto, mais estudos são necessários para analisar sua eficácia e suas variáveis que podem interferir em seu efeito antitumoral, como concentração, tipo de célula tumoral, biodisponibilidade e interação com outros compostos precisam ser melhor estabelecidos.

Conclusão

O presente estudo concluiu que a Artepelina C, substância isolada extraída da própolis verde brasileira, nesta concentração não foi capaz de reduzir a angiogênese, inflamação e crescimento tumoral no melanoma B16F10. No entanto, são necessários mais estudos para evidenciar o real efeito da Artepelina C no câncer, para averiguar se seu efeito é dependente de sua dose, biodisponibilidade, tipo de célula tumoral avaliada ou mistura com outros compostos de própolis concomitante.

Referências

ÁLVAREZ, Teresita Zambrana. Benefícios de la fitoterapia. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Habana, v. 10, n. 2, p. 1-2, ago. 2005.

ARRUDA, Caroline. **Estudos de estabilidade do artepelin C, do ácido p-cumárico e avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e citotóxica dos produtos de degradação majoritários**. 2019. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

BERRETTA, Andresa A.; ARRUDA, Caroline; MIGUEL, Felipe Galeti; BAPTISTA, Nathalia; NASCIMENTO, Andresa Piacuzzi; MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane; HORI, Juliana Issa; BARUD, Hernane da Silva; DAMASO, Bianca; RAMOS, César. Functional Properties of Brazilian Propolis: from chemical composition until the market. **Superfood And Functional Food - An Overview Of Their Processing And Utilization**, [S.L.], p. 56-98, 1 mar. 2017. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/65932>.

COSTA, Philipe; ALMEIDA, Marília O.; LEMOS, Marivane; ARRUDA, Caroline; CASOTI, Rosana; SOMENSI, Lincon Bordignon; BOEING, Thaise; MARIOTT, Marihá; SILVA, Rita de Cássia Melo Vilhena de Andrade Fonseca da; STEIN, Bruna de Paoli. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 226, p. 82-89, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.006>.

COSTA, Philipe; BOEING, Thaise; SOMENSI, Lincon Bordignon; CURY, Benhur Judah; ESPÍNDOLA, Vanessa Lopes; FRANÇA, Tauani Caroline Santos; ALMEIDA, Marília Oliveira; ARRUDA, Caroline; BASTOS, Jairo Kenupp; SILVA, Luisa Mota. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **Biofactors**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 479-489, 11 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1503>.

DAVIS, Lauren E.; SHALIN, Sara C.; TACKETT, Alan J.. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 1366-1379, 1 ago. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>

DIMATOS, Dimitri Cardoso; DUARTE, Felipe Oliveira; MACHADO, Robson Schmitt; VIEIRA, Vilberto José; VASCONCELLOS, Zulmar Antonio Accioli de; BINS-ELY, FISCHER, Grant M.; GOPAL, Y. N. Vashisht; MCQUADE, Jennifer L.; PENG, Weiyi; DEBERARDINIS, Ralph J.; DAVIES, Michael A.. Metabolic strategies of melanoma cells: mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 11-30, 2 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pcmr.12661>

FISCHER, S. O. Hübner, G. D. Vargas, and T. Vidor, "Imunomodulação pela própolis," **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 75, no. 2, pp. 247–253, 2008. View at: [Google Scholar](https://scholar.google.com/citations?user=...)

GASTALDELLO, Gabriel H.; CAZELOTO, Ana Caroline V.; FERREIRA, Juliana C.; RODRIGUES, Débora Munhoz; BASTOS, Jairo Kennup; CAMPO, Vanessa L.; ZOCCAL, Karina F.; TEFÉ-SILVA, Cristiane. Green Propolis Compounds (Baccharin and p-Coumaric Acid) Show Beneficial Effects in Mice for Melanoma Induced by B16f10. **Medicines**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 20, 30 abr.

2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/medicines8050020>.

GUY, Gery P.; THOMAS, Cheryl C.; THOMPSON, Trevor; WATSON, Meg; MASSETTI, Greta M.; RICHARDSON, Lisa C.. Vital Signs: Melanoma Incidence and Mortality Trends and Projections — United States, 1982–2030. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 21, n. 64, p. 591-596, 5 jun. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Tipos de câncer. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>. Acesso em: 05 jun 2021.

JUNG, Joo Eun; KIM, Hong Sook; LEE, Chang Seok; PARK, Dae-Hun; KIM, Yong-Nyun; LEE, Min-Jae; LEE, Jung Weon; PARK, Jong-Wan; KIM, Myung-Suk; YE, Sang Kyu. Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. **Carcinogenesis**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 1780-1787, 8 jun. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgm130>.

LINARES, Miguel A.; ZAKARIA, Alan; NIZRAN, Parminder. Skin Cancer. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 645-659, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2015.07.006>

MACHADO, Joleen Lopes; ASSUNÇÃO, Anne Karine Martins; SILVA, Mayara Cristina Pinto; REIS, Aramys Silva; COSTA, Graciomar Conceição; ARRUDA, Diêgo de Sousa; ROCHA, Bruno Alves; VAZ, Mirela Mara de Oliveira Lima Leite; PAES, Antonio Marcus de Andrade; GUERRA, Rosane Nassar Meireles; BERRETTA, Andresa Aparecida; NASCIMENTO, Flávia Raquel Fernandes. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2012, p. 1-10, 2012

ORSOLIC N, Basic I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **J Ethnopharmacol**. 84:265–27, 2003;

PIETTA PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**.;73:7–20, 2002.

REED, John C.. Mechanisms of Apoptosis. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 157, n. 5, p. 1415-1430, nov. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64779-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64779-7).

RODRIGUES, Ana Sofia de Oliveira. **Treatment of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma: Immunotherapy or Target Therapy?** Orientador: Américo Manuel Costa Figueiredo. 2021. Trabalho final do Mestrado Integrado em Medicina – Universidade de Coimbra, [S.], 2021

SAWICKA, Diana; CAR, Halina; BORAWSKA, Maria Halina; NIKLIŃSKI, Jacek. The anticancer activity of propolis. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, [s. l], v. 50, n. 1, p. 25-37, jan. 2012.

SCHADENDORF, Dirk; VAN AKKOOI, Alexander C J; BERKING, Carola; GRIEWANK, Klaus G; GUTZMER, Ralf; HAUSCHILD, Axel; STANG, Andreas; ROESCH, Alexander; UGUREL, Selma. Melanoma. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10151, p. 971-984, set. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31559-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31559-9).

SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. Janeiro de 2013. **Quimioterapia adjuvante com alfainterferona no tratamento do melanoma cutâneo**, Brasília: Ministério da Saúde, p. 1-26, Janeiro 2013.

SPAGNOLO, Francesco; BOUTROS, Andrea; TANDA, Enrica; QUEIROLO, Paola. The adjuvant treatment revolution for high-risk melanoma patients. **Seminars In Cancer Biology**, [S.L.], v. 59, p. 283-289, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.024>

VERHOEF MJ, Rose MS, White M, Balneaves LG. Declining conventional cancer treatment and using complementary and alternative medicine: a problem or a challenge?. **Curr Oncol.**;15 Suppl 2(Suppl 2):s101-s106, 2008. doi:10.3747/co.v15i0.281