

Avaliação do composto ácido ferúlico na resposta histopatológica e imunológica frente ao melanoma B16F10 em modelo experimental

Autores: Thálita Cristina de Sousa Beine¹, Cristiane Tefé-Silva²

Colaboradores: Karina F. Zoccal³, Vanessa L. Campo³

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

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

Resumo

O melanoma, dentre as neoplasias de pele, apresenta a maior taxa de mortalidade. O Ácido Ferúlico (AF) é conhecido por possuir atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antineoplásica. Este estudo avaliou a resposta do Ácido Ferúlico frente ao melanoma. Notou-se uma redução significativa de neutrófilos no sangue periférico dos camundongos com o tumor tratados com AF. O AF não reduziu angiogênese, mitoses e crescimento tumoral no melanoma B16F10 em camundongos.

Introdução

O melanoma é o câncer de pele proveniente de melanócitos e possui uma etiologia heterogênea, pois sua origem está relacionada a fatores genéticos e fenotípicos (OSTROWSKI; FISHER, 2021; PANDIANI *et al.*, 2017). No Brasil, são estimados mais de 8000 casos por ano e cerca de 1900 mortes, promovendo um impacto significativo na saúde pública do país (BRASIL, 2022). Por conseguinte, a incidência desta neoplasia apresentou aumento nas últimas décadas devido a migração de pessoas de peles claras para regiões próximas à Linha do Equador e novos hábitos de exposição solar, chegando a um aumento de quase 300% em 30 anos nos Estados Unidos (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Nesse sentido, a incidência de melanomas com piores prognósticos também cresceu na população idosa masculina (GIBLIN; THOMAS, 2007). Contudo, ele também afeta populações mais jovens. Esses fatores, associados à capacidade de metastatizar do tumor, tornam o melanoma um dos cânceres de maior preocupação para saúde pública (BRASIL, 2022; MATTHEWS *et al.*, 2017).

Assim, um dos principais fatores ambientais envolvidos na origem da doença é radiação UV (Ultravioleta), a qual a exposição é capaz tanto de afetar o material genético da célula, como também é capaz de gerar um estresse oxidativo, que por sua vez está envolvido no dano ao DNA e demais fases da patogênese da doença como desenvolvimento, crescimento, invasão e,

também, na resistência a drogas em células de melanoma (OBRADOR *et al.*, 2018).

A evolução desta neoplasia engloba uma fase de crescimento vertical, na qual há uma forte tendência a invasão dos tecidos adjacentes. Conjuntamente, ocorre também metástases locais, regionais e à distância. Tal comportamento, dificulta o tratamento do tumor caso ele não seja diagnosticado em fases iniciais (OSTROWSKI; FISHER, 2021). Em tal âmbito, os tratamentos existentes baseiam-se na retirada cirúrgica das áreas afetadas e linfonodos atingidos, quimioterapia e imunoterapias (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Entretanto, mesmo existindo tais opções terapêuticas, ainda há a possibilidade do tumor ser resistente às drogas empregadas e, também, de reincidir após os tratamentos empregados (OSTROWSKI; FISHER, 2021).

Sob essa perspectiva, a própolis verde é uma substância coletada por abelhas melíferas de diferentes materiais provindos de árvores, o que confere um aspecto resinoso e possui diversas substâncias em sua composição (PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002). Dentre elas, pode-se encontrar o ácido ferúlico (AF), o qual possui atividades anti-inflamatória, antineoplásica, antimicrobiana, imunorreguladora, entre outras propriedades (CASTRO *et al.*, 2007; ZDUŃSKA *et al.*, 2018). Por conta de tantos benefícios já descritos, principalmente no que envolve efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, a própolis é usado com fins medicinais há muito tempo na história da humanidade (PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002).

Dessa forma, em vista da necessidade de buscar novas opções terapêuticas para o melanoma, no presente estudo avaliou-se os aspectos imunológicos e patológicos da resposta tumoral mediante a utilização do ácido ferúlico, isolado a partir da própolis verde, em melanomas B16F10 induzidos experimentalmente em camundongos Balb/C.

Objetivos

Geral

Analisar a propriedade antitumoral do ácido ferúlico em resposta ao melanoma B16F10 induzido experimentalmente. As análises serão relativas aos aspectos patológicos e imunológicos e histopatológicos da progressão e resposta tumoral em camundongos.

Específicos

Avaliar o aspecto macroscópico a partir da identificação de presença de ulcerações, tamanho e espessura das lesões.

Realizar a análise do aspecto histopatológica a partir de análises microscópica, qualitativa (descrição dos tumores, melanina) e morfométrica (quantificação de mitoses, número de vasos e de células inflamatórias).

Verificar a capacidade desse composto em alterar o desenvolvimento do tumor utilizando-se de aspectos cutâneos no camundongo (tamanho e peso tumoral) e modulação de resposta inflamatória.

Materiais e Métodos

Isolamento do Ácido Ferúlico a partir do Própolis Verde

Os extratos etanólicos da própolis (EEP) foram preparados a partir da adição de 15mL de etanol (80%) a 2 gramas de própolis triturada e homogeneizada. A extração foi feita por 30 minutos a 70°C e sob agitação contínua. Após essas etapas, realizou-se uma centrifugação a 7500 x g, a 5°C por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio (15 x 160 mm). Foram adicionados 10 mL de etanol (80%) ao precipitado do tubo de centrífuga, sendo feita mais uma extração. Os sobrenadantes obtidos das duas extrações foram homogeneizados e resfriados a 5°C. Os extratos metanólicos vegetais de *B. dracunculifolia* foram obtidos pela extração de 2 gramas de gemas vegetativas em 10 mL de metanol P.A. durante 30 minutos a 60°C, seguida de centrifugação a 7500 x g, a 5°C, durante 10 minutos.

Cuidado com os Animais

Foram obtidos camundongos da linhagem Balb/C de aproximadamente 20g do biotério do Centro Universitário Barão de Mauá. Os roedores foram mantidos em ambiente com umidade e possuíram dieta padrão e água de torneira *ad libitum*.

Todos os procedimentos desenvolvidos ocorreram conforme as normas éticas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais sob o protocolo N° 457/22.

Cultura Celular

Foi realizado o cultivo de células do melanoma B16F10 em meio de cultura. Quando atingiram a fase de crescimento exponencial, foram contadas e selecionadas a concentração de 10^6 células/mL de solução salina 0,9%.

Desenho Experimental

Os animais (n=26) foram divididos em 4 grupos:

-Grupo 01- Melanoma: recebeu a inoculação de células B16F10 para formação do melanoma + PBS

-Grupo 02- Melanoma + Ferúlico: recebeu a inoculação de células B16F10 para formação do melanoma + tratamento ácido ferúlico.

-Grupo 03- Controle: Grupo controle, recebe PBS (v.o)

-Grupo 04- Controle + Ferúlico= tratamento com ácido ferúlico;

Ademais, os camundongos foram tricotomizados em suas regiões dorsais com o auxílio de uma máquina de barbear Panasonic (em torno de 1.5 cm de diâmetro). Inicialmente, no primeiro dia de experimento, os animais que pertenceram ao grupo 01 (n= 08) e ao grupo 02 (n=08) receberam a inoculação de células B16F10 em uma concentração de 10^6 células/0.1 mLs em 0.9% PBS na região tricotomizada. O grupo 03 (n=05) e grupo 04 (n=05) receberam 0.9% no tecido subcutâneo de suas regiões dorsais. Após a inoculação do melanoma, os grupos 02 e 04 receberam 300 μ ls de ácido ferúlico via gavagem durante nos dias 05, 10, 15, 21 e 26. Já os grupos 01 e 03 receberam 300 μ ls de PBS via gavagem nos dias 05, 10, 15, 21 e 26. Desta forma, acompanhou-se a evolução do tumor e a sobrevivência dos animais.

Peso do Tumor

Foi obtido a partir da pesagem da massa tumoral isolada com a menor quantidade de tecido adjacente possível.

Contagem de Células Inflamatórias no sangue periférico

Após anestesia com Cetamina/Xilazina, foi realizado a coleta de amostra de sangue através do plexo retro orbital com o auxílio de uma pipeta de Pasteur contendo heparina. Por conseguinte, a contagem das células foi procedida em uma solução Turk utilizando-se uma câmara de Neubauer. A contagem de leucócitos diferenciais foi realizada em uma preparação de citosina com

o auxílio de um kit comercial de Romanowky. Contou-se cem células em campos aleatórios utilizando-se a ampliação de 100x de um microscópio de luz.

Avaliação Histológica

Para a realização da avaliação histológica, foram obtidas amostras do tumor, preservando-se as margens teciduais adjacentes à área tumoral para evitar o comprometimento das áreas que seriam analisadas. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de formaldeído a 10% e foram desidratadas utilizando-se álcool etílico em séries crescentes (70%, 80%, 90% e 100%). Após, utilizando-se como reagente o xilol, deu-se seguimento no processo de diafanização. Realizou-se a preparação dos blocos de parafina, que foram cortados (4 µm) e corados com hematoxilina e eosina (HE). Já para a realização da avaliação morfométrica, utilizou-se um microscópio Nikon eclipse E200 acoplado a uma câmera de vídeo (Tucsen USB 2.0 H Series) para analisar as amostras obtidas. Assim, deu-se seguimento na quantificação de vasos tumorais primários, numa magnificação de 100x, em 15 campos microscópicos não coincidentes. Foi utilizado o Software “ImageJ” para confecção de barra com 200 pixels (100x). As células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) foram quantificadas em uma magnificação de 400x também em 15 campos aleatórios não coincidentes. Foi utilizado o Software “ImageJ” para confecção de barra com 800 pixels (400x).

Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos, utilizou-se o software GraphPad v 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Após, a partir dos dados, obteve-se a média +/- erro padrão da média. Com a finalidade de se obter a diferença entre dois grupos, utilizou-se o teste *t-Student*. Já, para a comparação entre múltiplos grupos, o teste ANOVA (análise unidirecional de variância) foi realizado seguido pelo teste de Tukey. Considerou-se o valor $p < 0.05$ como estatisticamente significativo.

Resultados e Discussão

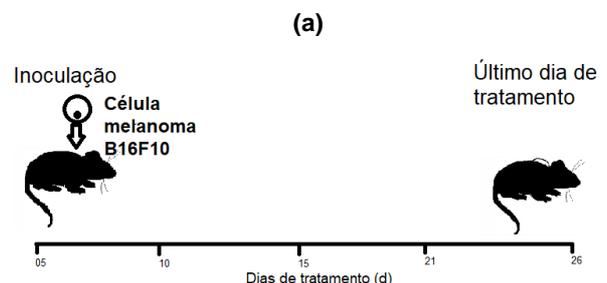
A própolis verde é uma substância resinosa utilizada com fins medicinais há muito tempo pela humanidade (PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002). Assim, um outro estudo, conduzido por esse grupo de pesquisa, demonstrou efeitos benéficos com o uso de outros compostos provenientes da própolis verde em camundongos que receberam inoculação de células de melanoma B16F10, no qual o ácido p-Cumárico e a Bacarina demonstraram atividades no crescimento e progressão do tumor, como também na

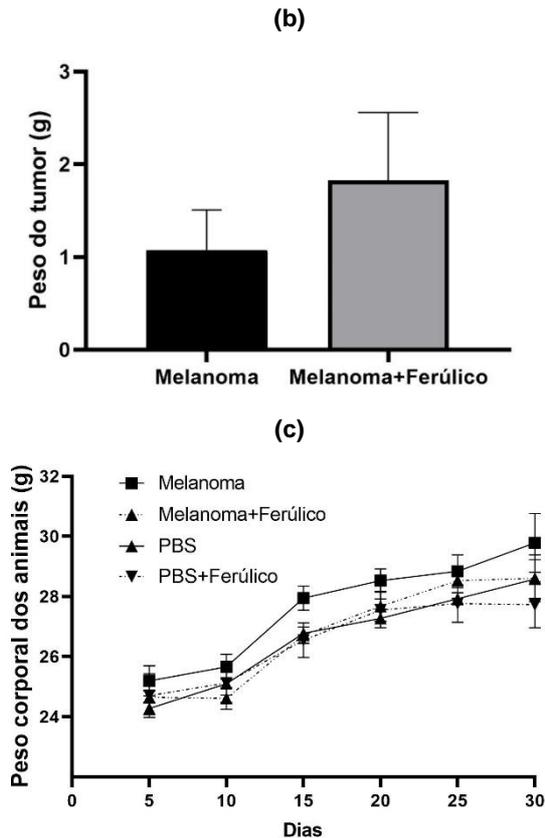
angiogênese, número de mitoses e modulação de atividade inflamatória (Gastaldello *et al.* 2021). Desta forma, o presente estudou analisou os efeitos do ácido ferúlico, por conta de suas atividades anti-inflamatórias, antineoplásicas e imunorreguladoras, no desenvolvimento de melanoma B16F10 em camundongos da linhagem Balb/C, a partir da avaliação do crescimento tumoral, mitoses celulares, angiogênese e inflamação (CASTRO *et al.*, 2007; ZDUŃSKA *et al.*, 2018).

Crescimento do tumor e monitoramento dos camundongos

O crescimento do tumor foi monitorado nos dias 5, 10, 15, 21 e 26 do experimento com o auxílio de um paquímetro. No fim do experimento, as áreas que apresentaram concentração visível de melanina foram extraídas para análise. Em relação à sobrevivência dos animais, não houve diferença entre os grupos, uma vez que não houve a morte de nenhum animal durante a progressão do experimento. No estudo conduzido pelo mesmo grupo anteriormente, encontrou-se resultado similar com o uso do ácido p-Cumárico e Bacarina. Ainda nesse contexto, a partir da análise do peso das massas tumorais retiradas dos animais no momento do sacrifício, não houve diferença estatisticamente relevante no peso do tumor (g) nas doses utilizadas de AF em relação ao grupo controle.

Figura 1. (a) Ilustração representando o crescimento do tumor nos grupos 1 e 2 conforme a progressão do tratamento. (b) Representação gráfica do peso corporal dos animais (g) nos 4 grupos analisados. (c) Representação gráfica do peso do tumor (g) nos grupos em que foram inoculadas as células de Melanoma B16F10.





Fonte: próprio autor

Análise do Ácido Ferúlico nas mitoses celulares

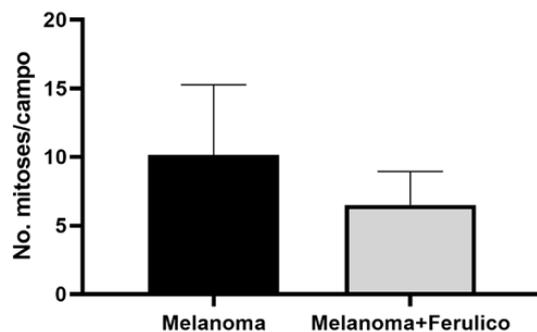
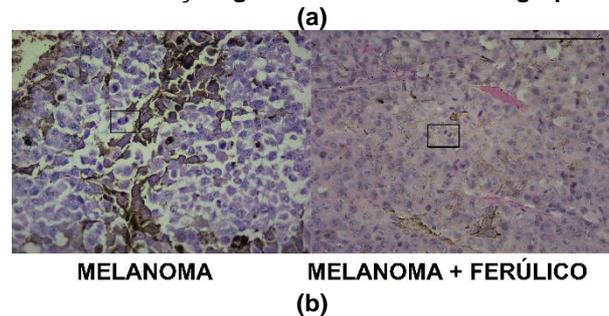
Para ocorrer a evolução tumoral, as células neoplásicas precisam passar pelo processo de mitose e, em contrapartida, precisam evitar formas de passar pelo processo de apoptose (TULI *et al.* 2022). Dessa forma, a contagem de mitoses celulares é um parâmetro para análise da capacidade proliferação e invasão de tecidos adjuvantes. Assim, o número de mitoses celulares foi quantificado nos fragmentos histológicos obtidos dos animais nos quais foram introduzidas, no seu tecido subcutâneo, células de melanoma B16F10, sendo tratados com o ácido ferúlico (Grupo 2) ou com PBS (Grupo 1). O tratamento com ácido ferúlico não apresentou diferença significativa na concentração adotada em relação ao tratamento com PBS. Utilizou-se o valor $p < 0,05$ para determinar diferenças significativas no teste *t-Student*.

Em associação, no estudo conduzido por Kamm *et al.* (2019), o composto foi capaz de apresentar um potencial anticâncer em células melanoma A375, uma vez que apresentou efeito antiproliferativo. Entretanto, no mesmo estudo, o composto isolado não aumentou significativamente o número de células apoptóticas. Esse efeito só ocorreu quando o ácido ferúlico foi associado com 2-Methoxyestradiol. Já em outro estudo conduzido por Yoon *et al.* (2015), o AF apresentou efeito citostático em células de melanoma B16F10 e não

citotóxico, o qual era esperado. Desta forma, talvez o composto necessite de outros adjuvantes para produzir resultados mais efeitos positivos na dose utilizada nesse estudo.

Uma das principais maneiras do organismo impedir a proliferação desordenada de células é através da apoptose (KAMM *et al.*, 2019). No estudo conduzido por Zhang, Wu e Yang (2017), foi mostrado que o ácido ferúlico pode promover a apoptose por meio da ativação da caspase-3 e Bax, as quais quando ativas levam a eventos que são responsáveis pela apoptose da célula. Concomitante, também ocorreu a inativação de Bcl-2, o qual é capaz de inibir a apoptose das células. Tais processos, reduziram a viabilidade de células de osteossarcoma tratadas com AF quando comparadas ao grupo controle. Em relação ao melanoma, na vigência de tal patologia, existe um aumento da expressão de Bcl-2, o que pode representar um importante aspecto para viabilidade do tumor e sua resistência a drogas, já que tal gene participa do processo de inibição da apoptose (EBERLE; HOSSINI, 2008).

Figura 2. (a) Imagem representativa da contagem de mitoses com aumentos originais de 400x. (b) Representação gráfica da análise de mitoses. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.



Fonte: próprio autor

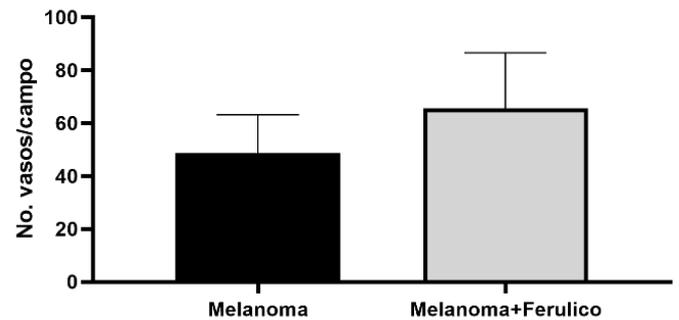
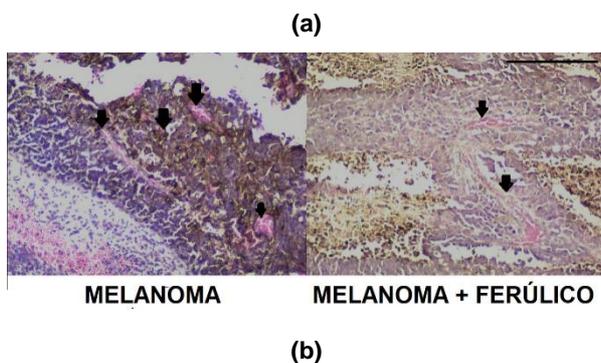
Análise do Ácido Ferúlico na proliferação de vasos

Uma forma que o tumor encontra para crescer e invadir a corrente sanguínea é através do processo de angiogênese, ou seja, formação de novos vasos para fornecimento de nutrientes à massa tumoral e, também, sua disseminação. Por meio

desse evento, o tumor é capaz de estabilizar seu processo de crescimento e, também, atingir outros sítios. Nesse estudo, o número de vasos foi quantificado mediante a contagem em campos não coincidentes de vasos, utilizando-se da microscopia ótica. O tratamento com ácido ferúlico não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento com PBS nas doses empregadas. Utilizou-se o valor $p < 0,05$ para determinar diferenças significativas no teste *t-Student*.

A angiogênese é um evento crucial para a instalação de diversas doenças, incluindo o câncer, pois por meio dela o tumor encontra uma forma facilitada de crescimento e proliferação (TULI *et al.*, 2022). Nessa perspectiva, esse processo ocorre devido a combinação de vários fatores. Nesse sentido, no estudo realizado por Lin *et al.* (2010) demonstrou-se que o AF poderia atuar em *in vitro* e *in vivo* como estimulador da angiogênese em processos isquêmicos, sendo essa substância capaz de estimular VEGF, PDGF e HIF-1 α , fatores capazes de regular positivamente a proliferação de vasos. Contudo, em um outro estudo, o AF apresentou atividade contrária ao diminuir o processo de angiogênese em melanoma, pois reduziu a atividade de FGFR1 e também fosforilação de PI3K e Akt, os quais são fatores envolvidos na migração, invasão e diferenciação de células endoteliais para formação de novos vasos sanguíneos. Assim, o estudo concluiu que além de ser capaz de inibir a proliferação de vasos, o AF também pode inibir diretamente a migração de células cancerígenas para outros locais. Desta forma, ele possui uma alta potencialidade em se tornar uma droga anti-angiogênica (YANG; JIANG; LU, 2015). Ademais, no estudo conduzido por este grupo anteriormente, demonstrou-se que a bacarina e ácido p-cumárico, outros compostos presentes na própolis verde, também foram capazes de reduzir a proliferação de vasos tumorais (Gastaldello *et al.* 2021).

Figura 3. (a) Imagem representativa do processo de angiogênese tumoral com aumentos originais de 100x. (b) Representação gráfica da análise da angiogênese tumoral. Não houve diferença significativa entre os dois grupos analisados.



Fonte: próprio autor

Efeitos do Ácido Ferúlico na inflamação nas células tumorais

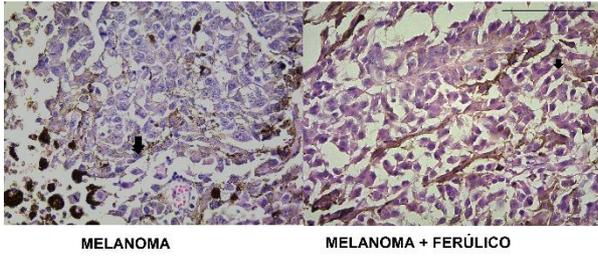
O processo de inflamação está envolvido no desenvolvimento de muitas patologias, incluindo o melanoma. Assim, para analisar tal aspecto, avaliou-se a presença de células inflamatórias nos fragmentos de pele com melanoma em campos não coincidentes, por meio da microscopia ótica. Também, utilizou-se amostras de sangue periférico para realizar tal análise na corrente sanguínea. Dessa forma, observou-se e quantificou-se macrófagos, linfócitos e neutrófilos.

Em relação a análise histológica das células inflamatórias, foi possível observar um aumento na quantidade de macrófagos nos grupos com melanoma. Em comparação com grupo tratado com ácido ferúlico, foi possível observar uma pequena redução, entretanto, não houve diferença estatística entre os dois grupos (Figura 4).

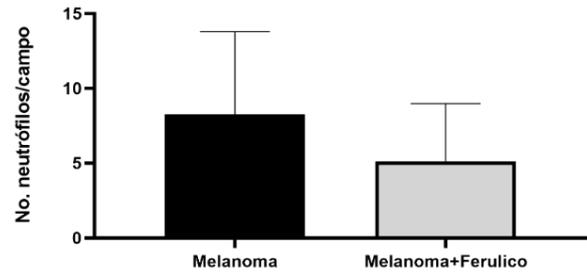
Resultados semelhantes foram observados na contagem de linfócitos e neutrófilos no tecido nos grupos 1 e 2. Houve um aumento significativo destas células no grupo melanoma. No entanto, houve uma pequena redução do número destas células nos camundongos tratados com ácido ferúlico, mas não apresentou diferença estatística significativa.

Figura 4. (a) Imagem representativa da contagem de macrófagos. (b) Representação gráfica da contagem de macrófagos. (c) Imagem representativa da contagem de linfócitos. (d) Representação gráfica da contagem de linfócitos. (e) Imagem representativa da contagem de neutrófilos. (f) Representação gráfica da contagem de neutrófilos. Não houve diferença estatística significativa nas três análises. Aumentos originais das imagens: 400x

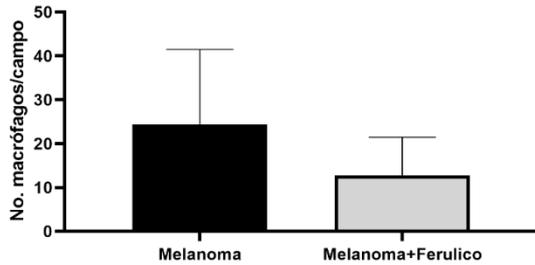
(a)



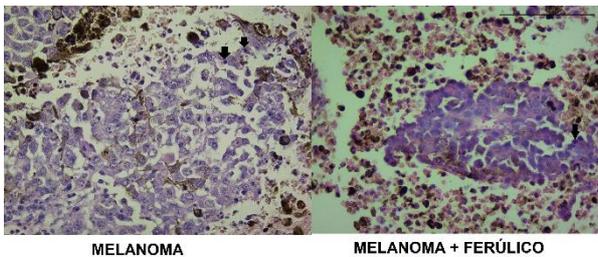
(b)



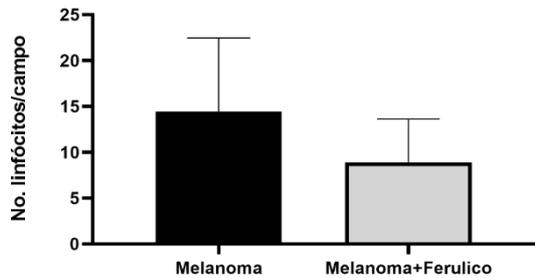
Fonte: próprio autor



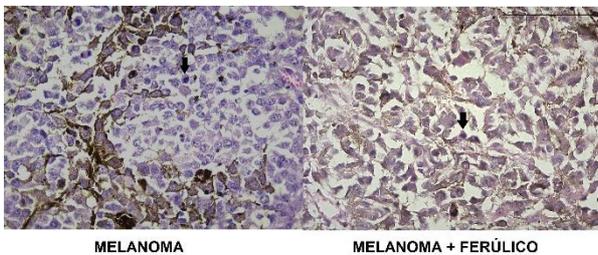
(c)



(d)



(e)



(f)

Em relação a análise do sangue periférico coletado dos animais após a eutanásia, como mostrado na Figura 05 (c), constatou-se que a contagem de células mononucleares não apresentou diferenças estatisticamente relevantes com as doses utilizadas entre os quatro grupos analisados. Contudo, como mostrado na Figura 05 (a), o número de leucócitos totais nos grupos que receberam a inoculação de células de melanoma B16F10 foi maior do que nos grupos que não receberam, porém o grupo tratado com o AF não apresentou diferença estatística relevante quando comparado com o seu controle.

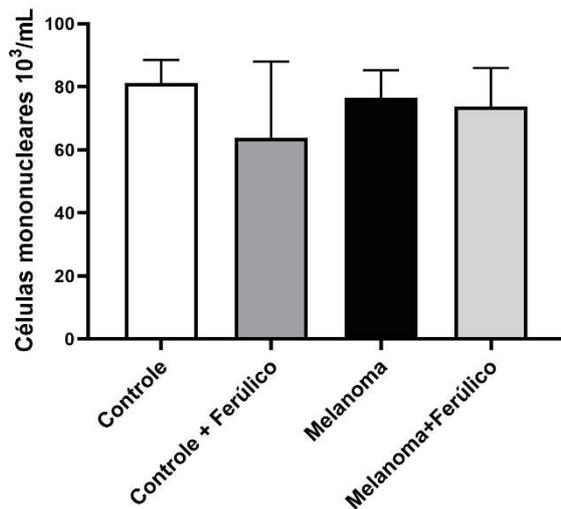
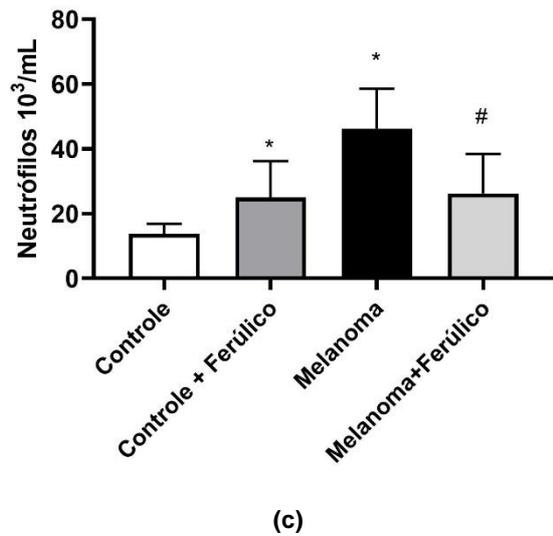
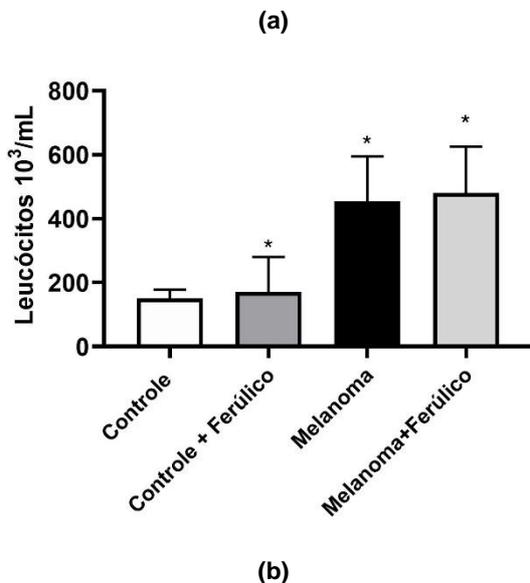
Ainda, a análise de neutrófilos demonstrou que o grupo que recebeu a inoculação de células melanoma B16F10 e foi tratado somente com PBS obteve um aumento estatisticamente significativo quando comparado tanto aos demais grupos, assim como demonstrado na Figura 5 (b).

Os neutrófilos são células importantes dentro do processo inflamatório, sendo as primeiras células do sangue que atingem o tecido lesado. No início do desenvolvimento tumoral, os neutrófilos, em conjunto com outros componentes do sistema de defesa, podem identificar e eliminar células neoplásicas. Em contrapartida, se a eliminação completa destas células neoplásicas não ocorrer de forma adequada, elas podem secretar fatores que suprimem a resposta antitumoral e, inclusive, são capazes de fazer com que neutrófilos contribuam com esse processo, ao liberar citocinas e outros mediadores inflamatórios que levam a migração de mais células para aumento da massa tumoral. As células polimorfonucleares que participam do processo tumoral são denominadas como Neutrófilos Associados ao Tumor (TAN) e são polarizadas, a partir da presença ou ausência de reguladores inflamatórios, em dois fenótipos diferentes: TAN N1 (antitumoral) e TAN N2 (pró-tumoral). Tais neutrófilos podem favorecer ou inibir a proliferação de células tumorais, porém a própria presença de TANs já foi associada a desfechos mais clinicamente desfavoráveis (BASTOS, 2016). Desta forma, a redução encontrada de neutrófilos na corrente sanguínea dos camundongos tratados

com AF, demonstra que o composto pode auxiliar na regulação da atividade inflamatória.

Por outro lado, esse mesmo efeito não foi observado na análise histopatológica das lesões tumorais, fator esse que pode estar associado com a dose utilizada do composto no estudo, a biodisponibilidade do composto no local em que deveria efetuar sua ação e sua utilização sem associação a outro composto, uma vez que no estudo conduzido por Maruyama *et al.* (2018), demonstrou-se efeitos anti-inflamatórios do composto ácido ferúlico quando associado ao ácido cafeico. Os quais foram responsáveis por impedir a fosforilação de tirosina mediada por CK2, sendo a CK2 mediadora de processos inflamatórios envolvidos na exposição a luz UV, como a ativação de NF- κ B. Uma outra atividade inflamatória do AF foi pesquisada no estudo conduzido por Sakai *et al.* (1999), no qual registrou-se diminuição da produção de proteína inflamatória macrofágica 2 (MIP-2) em células infectadas com vírus sincicial respiratório e tratadas com o composto. Assim, a atividade do composto em células inflamatórias já foi pesquisada de forma isolada ou em associação com outras substâncias.

Figura 5. Representação gráfica da análise dos leucócitos totais (a), neutrófilos (b) e células mononucleares (c) no sangue periférico. Houve diferenças estatística significante nas análises de leucócitos totais (a) e neutrófilos (b). $p < 0.05$, * (comparação com grupo controle); # (comparação grupos: Melanoma e Melanoma+Ferúlico).



Fonte: próprio autor

Conclusão

O presente estudo demonstrou diferenças significativas na quantidade de leucócitos totais em camundongos com o tumor melanoma B16F10 quando comparados aos grupos controles e principalmente, e, também, demonstrou uma redução de neutrófilos em amostras de sangue periférico no grupo tratado com AF. Tais achados podem indicar uma possível atividade anti-inflamatória do AF na vigência de um melanoma. Contudo, não foi capaz de demonstrar redução na angiogênese, redução de outras células da resposta imune tumoral e nem diminuição do crescimento tumoral no melanoma B16F10. Portanto, são necessários outros estudos para melhor elucidar se atividade do composto é dependente da dose, biodisponibilidade, tipo de célula tumoral avaliada ou presença de outras substâncias adjuvantes.

Referências

BASTOS, Daniel Arthur Guimarães. **Efeitos de microvesículas de melanoma na polarização de neutrófilos humanos**. 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências, Centro Biomédico::instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://www.bdt.d.uerj.br:8443/handle/1/16315>. Acesso em: 21 mar. 2023.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. . **Câncer de pele melanoma: estatísticas**. Estatísticas. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CARR, Stephanie *et al.* Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics Of North America**, [S.L.], v. 100, n. 1, p. 1-12, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>.

CASTRO, Myrella Léssio *et al.* Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000700003>.

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/10.1080/15384047.2019.164003>.

EBERLE, Jurgen; HOSSINI, Amir. Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. **Current Genomics**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 409-419, 1 set. 2008. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138920208785699571>. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cg/2008/00000009/00000006/art00005>. Acesso em: 03 mar. 2023.

GASTALDELLO, Gabriel H. *et al.* 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>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33946188/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

GIBLIN, A.-V.; THOMAS, J.M.. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. **Journal Of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 32-40, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2006.05.008>.

KAMM, Anna *et al.* 2-Methoxyestradiol and Its Combination with a Natural Compound, Ferulic Acid, Induces Melanoma Cell Death via Downregulation of Hsp60 and Hsp90. **Journal Of Oncology**, [S.L.], v. 2019, p. 1-12, 2 out. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/9293416>.

LIN, Chiu-Mei *et al.* Ferulic acid augments angiogenesis via VEGF, PDGF and HIF-1 α . **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 627-633, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.04.001>.

MARUYAMA, Hiroko *et al.* Biochemical Characterization of Ferulic Acid and Caffeic Acid Which Effectively Inhibit Melanin Synthesis via Different Mechanisms in B16 Melanoma Cells. **Biological And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 806-810, 1 maio 2018. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b17-00892>.

MATTHEWS, Natalie H. *et al.* Epidemiology of Melanoma. **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**, [S.L.], p. 3-22, 5 dez. 2017. Codon Publications. <http://dx.doi.org/10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017.ch1>.

OBRADOR, Elena *et al.* Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. **Biological Chemistry**, [S.L.], v. 400, n. 5, p. 589-612, 31 out. 2018. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2018-0327>.

OSTROWSKI, Stephen M. *et al.* Biology of Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics Of North America**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 29-56, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010>.

PANDIANI, Charlotte *et al.* Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. **Genes & Development**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 724-743, 15 abr. 2017. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.296962.117>.

PIETTA, P.G.; GARDANA, C.; PIETTA, A.M.. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 7-20, nov. 2002.

Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00186-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00186-7).

SAKAI, S. *et al.* Inhibitory Effect of Ferulic Acid and Isoferulic Acid on the Production of Macrophage Inflammatory Protein-2 in Response to Respiratory Syncytial Virus Infection in RAW264.7 Cells. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 173-175, 3 ago. 1999. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09629359990513>.

TULI, Hardeep Singh *et al.* Ferulic Acid: a natural phenol that inhibits neoplastic events through modulation of oncogenic signaling. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 21, p. 7653-7671, 7 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27217653>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/21/7653>. Acesso em: 09 mar. 2023.

YANG, Guang-Wei; JIANG, Jin-Song; LU, Wei-Qin. Ferulic Acid Exerts Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity by Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor 1-Mediated Angiogenesis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 24011-24031, 12 out. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms161024011>.

YOON, Hoon Seok *et al.* Differential Effects of Methoxylated p-Coumaric Acids on Melanoma in B16/F10 Cells. **Preventive Nutrition And Food Science**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 73-77, 31 mar. 2015. The Korean Society of Food Science and Nutrition. <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2015.20.1.73>.

ZDUŃSKA, Kamila *et al.* Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. **Skin Pharmacology And Physiology**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 332-336, 2018. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000491755>.

ZHANG, Xu-Dong; WU, Qiang; YANG, Shu-Hua. Ferulic acid promoting apoptosis in human osteosarcoma cell lines. **Pakistan Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 127-131, 6 fev. 2017. Pakistan Journal of Medical Sciences. <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.331.12066>. Disponível em: <https://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/12066>. Acesso em: 09 mar. 2023.