

Avaliação da atividade antitumoral do ácido cumárico na progressão do melanoma maligno cutâneo em modelo experimental

Autores: Ana Caroline Vendrame Cazeloto, Cristiane Tefé-Silva

Colaboradores: Gabriel H. Gastaldello, Karina Furlani Zoccal

Centro Universitário Barão de Mauá

caroline.cazeloto@hotmail.com (Medicina), cristiane.silva@baraodemaua.br

Resumo

O melanoma é um câncer de pele agressivo e metastático. Através desse estudo, pesquisou-se a atividade antitumoral do ácido cumárico na progressão do melanoma. O experimento deu-se mediante o tratamento com ácido cumárico de camundongos previamente inoculados com células B16F10. Como resultado, reduziu o volume tumoral, a angiogênese, o número de neutrófilos e a taxa de mitoses, sugerindo ações favoráveis ao controle da neoplasia.

Introdução

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele derivado dos melanócitos, células especializadas na produção de melanina, extremamente agressivo, sendo uma das principais causas de mortalidade relacionada ao câncer devido ao seu alto poder metastático. Vários estudos têm demonstrado que a disseminação do melanoma é resultado de mutações genéticas e alterações do microambiente tumoral, caracterizadas pela superexpressão de proteínas capazes de favorecer a invasão tumoral e infiltração circundante (LEONARDI *et al.*, 2018). Além disso, o processo inflamatório está intimamente ligado à progressão do melanoma. A melanina desempenha um papel importante ao fornecer um "escudo" contra a prejudicial radiação ultravioleta (UV) que pode causar carcinogênese (BOO, 2019). Porém, um desequilíbrio entre apoptose reduzida, aumento da proliferação celular e da sobrevivência na epiderme dessas células produtoras de melanina dá origem ao que chamamos de nevo melanocítico. O número de nevos melanocíticos congênitos e adquiridos, a suscetibilidade genética, a história familiar, e padrões intensos e intermitentes de exposição ao sol desempenham um papel central no desenvolvimento do melanoma (BAUER; GARBE, 2003).

Nas últimas décadas, o melanoma cutâneo tornou-se uma das neoplasias de maior importância médica para estudo e pesquisa dada as altas taxas de incidência e mortalidade relatadas no mundo todo. No Brasil, de acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer) foi

previsto um aumento de quase 50% de casos novos em 10 anos. O crescente aumento na incidência desse tumor pode ser atribuído ao aumento da exposição dos indivíduos aos fatores de risco.

Atualmente, o diagnóstico, o prognóstico e a terapia do melanoma baseiam-se no sistema de estadiamento TNM que leva em consideração os fatores de risco clínico-patológicos: espessura do tumor, ulceração, taxa mitótica, estado do linfonodo sentinela e presença de metástases (COIT *et al.*, 2016). Esta neoplasia é particularmente difícil de tratar, especialmente quando diagnosticada em um estágio avançado, pois, as células de melanoma tendem a ser mais resistentes à radioterapia e quimioterapia. Os tratamentos atuais para melanoma metastático dependem de terapias direcionadas e imunoterapias (SOUYOY *et al.*, 2019). Por isso, muitos estudos são conduzidos nessa área a fim de criar novos métodos de tratamento que sejam menos invasivos e mais eficazes postergando a evolução da doença. Compostos fitoquímicos extraídos da raiz de plantas, bulbo, casca, folhas e hastes tem mostrado significativa atividade antitumoral e são promissores para inovar na quimioterapia (CHINEMBIRI *et al.*, 2014). Amplamente usados na medicina popular, tratamentos à base de plantas medicinais, podem ter valor terapêutico em uma série de doenças. No entanto, eles devem ser abordados com cautela e minuciosamente investigado, a fim de avaliar objetivamente sua eficácia e segurança (BRUNETTI *et al.*, 2019).

A própolis é uma mistura resinosa produzida pelas abelhas e utilizada na construção e proteção da colmeia. Este produto de origem natural é derivado de diferentes fontes botânicas. Assim, a composição mista da própolis depende da área geográfica e da flora local, os quais contribuem significativamente para sua heterogênea e complexa composição química (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2020). Vários grupos de estudos relataram que a administração local ou sistêmica de extrato de própolis exerce ação imunomoduladora, antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e antiangiogênica (LIMA *et al.*, 2014). A planta nativa brasileira

Baccharis dracunculifolia é a principal fonte de própolis verde no Brasil. Esta própolis específica tem uma composição fenólica particular que inclui ácido p-cumárico, contribuindo à sua capacidade antioxidante eficaz (CAVALARO *et al.*, 2019). Compostos fenólicos, como o ácido p-cumárico, com capacidade de neutralizar a atividade de radicais livres podem ser úteis na prevenção e/ou alívio de muitas doenças crônicas causadas por estresse oxidativo, dentre elas, o câncer (BOO, 2019).

A pesquisa de novos compostos com atividades antitumorais e mínimos efeitos colaterais é desafiadora. Muitas fontes naturais com atividade biológica significativa são inexploradas e poderiam contribuir para preencher essas lacunas. Sendo assim o presente estudo busca ampliar o conhecimento acerca dos modelos terapêuticos usando compostos da própolis verde, como o ácido cumárico, em um modelo experimental com camundongos.

Objetivos

O objetivo geral do estudo compreende a avaliação da capacidade antitumoral presente no ácido cumárico, em resposta ao melanoma B16F10 induzido experimentalmente. As avaliações abrangem os aspectos patológicos e imunológicos do desenvolvimento e resposta tumoral em camundongos. Os objetivos específicos centram-se na análise macroscópica das lesões (presença de ulcerações, tamanho das lesões, espessura), análise histopatológica, qualitativa (caracterização dos tumores, presença de células inflamatórias) e morfométrica (quantificação do número de vasos, presença de mitoses).

Métodos

Obtenção do composto Ácido cumárico

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. Posteriormente, o extrato obtido foi 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 Ácido cumárico puro. O composto foi suspenso em 997 µL de PBS (Phosphate buffer

saline) 1x e 3µL de DMSO (dimetilsulfóxido) sendo a concentração final de 1mg/mL. A Profa. Dr^a Vanessa Leiria Campo, em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP cedeu o composto isolado Ácido Cumárico a esse experimento.

Manutenção dos animais

Camundongos da linhagem Balb/C machos e fêmeas (6-8 semanas) de aproximadamente 20 gramas foram obtidos a partir do biotério do Centro Universitário Barão de Mauá (São Paulo, Brasil). Os animais 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).

Cultivo das células tumorais

Foram cultivadas células de melanoma da linhagem B16F10 em meio de cultura apropriado e, uma vez na fase confluenta, exibindo 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).

Experimento

Nesse experimento, os animais (n=22) foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento recebido, descritos assim:

- GRUPO 01: PBS - grupo controle, recebeu solução tampão salina-fosfato (PBS) via subcutânea e oral.
- GRUPO 02: PBS + Cumárico. Recebeu PBS via subcutânea + tratamento com composto ácido cumárico via oral.
- GRUPO 03: Tumor + PBS. Recebeu a inoculação de células B16F10 para formação do melanoma via subcutânea + PBS via oral.
- GRUPO 04: Tumor + Cumárico. Recebeu a inoculação de células B16F10 para formação do melanoma via subcutânea + tratamento com composto ácido cumárico via oral.

O experimento prosseguiu da seguinte forma: no primeiro dia, os camundongos tiveram sua região dorsal tricomicada com auxílio de um barbeador Panasonic (aproximadamente 1,5 cm de diâmetro). O grupo Tumor (n=7) e o grupo Tumor + Cumárico (n=7) foram inoculados subcutaneamente com células do melanoma B16F10 na concentração de 10⁶ células/mL em solução PBS a 0,9 %. O grupo controle (n=4) e o grupo Cumárico (n=4) receberam uma injeção de PBS a 0,9% também por via subcutânea na região dorsal.

Após inoculação do tumor, a cada 5 dias, os grupos selecionados para receber o tratamento,

Tumor + Cumárico e o grupo PBS+Cumárico, ingeriram via gavagem o composto cumárico por 26 dias (Figura 1). O grupo controle e o grupo Tumor receberam PBS durante 26 dias, contendo a mesma quantidade de álcool presente na solução do composto por via gavagem. A sobrevivência dos animais foi monitorada durante todo o experimento e após 30 dias da inoculação das células tumorais e 26 dias do tratamento os grupos experimentais foram sacrificados.

Figura 1 – Esquema representando o tratamento dos animais com o composto Ácido Cumárico



Obtenção e contagem das células inflamatórias no sangue periférico

Para a coleta das amostras de sangue os camundongos foram previamente anestesiados com Ketamina/xilazina através do plexo retro-orbital com a ajuda de uma pipeta Pasteur contendo heparina. Após esse processo, 3 mL de PBS foram aplicados na cavidade abdominal desses animais, a qual foi massageada gentilmente por 1 minuto, depois sofreram eutanásia em uma câmara de CO₂. A contagem das células sanguíneas foi realizada em uma solução de Turk usando uma câmara Neubauer. A contagem diferencial de leucócitos foi feita em preparações de citospinas manchadas usando um kit comercial de procedimentos Romanowsky. Cem células foram contadas em campos aleatórios em um aumento de 100x no microscópio óptico.

Análise do crescimento tumoral

Um paquímetro foi utilizado para medir as dimensões do tumor (em mm³) a cada 5 dias, durante todo o experimento. Sendo registrado de tal forma que volume do tumor = (comprimento x altura x largura) / 2.

Avaliação histológica

Para a avaliação histológica, amostras do tumor foram coletadas com margem de tecido adjacente para preservar o microambiente e fixadas em uma solução de formaldeído a 10%. 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 após preparados, foram seccionados (4 µm) e corados com hematoxilina e eosina (HE).

Avaliação morfométrica

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

Análise estatística

Através do software GraphPad v 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) foi realizada a análise estatística dos dados obtidos. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. O teste *T-Student* foi utilizado para avaliar as diferenças entre quaisquer dois grupos e para a comparação de múltiplos grupos foi realizada o teste ANOVA (análise de variância unidirecional) seguido do teste *post-hoc* Turkey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados e Discussão

Desde 2018, nosso grupo de pesquisa vem estudando sobre propriedades terapêuticas dos compostos naturais para o tratamento do melanoma e, até os dias atuais, reunimos diversas evidências promissoras. Os experimentos de Ireno *et al.* (2020) demonstraram que o tratamento com extrato hidroalcoólico da *Lobelia inflata* em camundongos inoculados com células do melanoma da linhagem B16F10 diminuiu significativamente o recrutamento de células e citocinas inflamatórias na cavidade peritoneal. E na pesquisa de Nascimento *et al.* (2019), o *Arctium lappa* exibiu robusta propriedade anti-inflamatória ao reduzir a inflamação gerada pelo desenvolvimento do tumor. Dando continuidade a essa pesquisa, o presente estudo analisou a possível atividade antitumoral do ácido cumárico na progressão do melanoma cutâneo em camundongos. A via subcutânea é amplamente utilizada para indução neoplásica a fim de avaliar terapias em muitos modelos tumorais, incluindo o melanoma B16, cuja linhagem apresenta elevado poder metastático (OVERWIJK; RESTIFO, 2000).

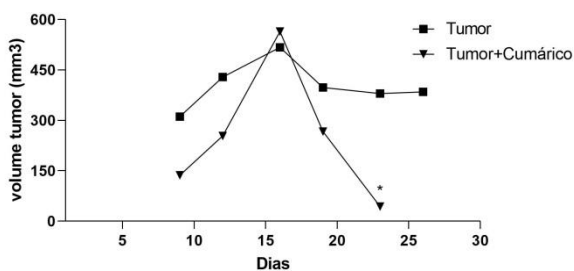
Crescimento tumoral e taxa de mitoses

Assim como outras formas de câncer, a progressão do melanoma depende de uma série de alterações moleculares orientadas para a sobrevivência resultando no desenvolvimento de clones de células tumorais selecionadas por sua capacidade de sobreviver a microambientes extremamente desfavoráveis e capazes de superar a falta de nutrientes (MATTIA *et al.*,

2018). Essas células conseguem enganar a resposta imune do hospedeiro, sobreviver a hipóxia, estresse oxidativo e indução da apoptose, no final desenvolvem uma notável propensão a disseminação metastática (MATARRESE *et al.*, 2010).

Baseado nisso, o crescimento do tumor nos camundongos da linhagem Balb/C foi monitorado por 26 dias após a injeção das células B16F10. Nesse período, 6 medições acerca do volume (em mm³) foram obtidas através da utilização de um paquímetro (Figura 2). Com relação aos resultados obtidos, ambos os grupos começaram a demonstrar crescimento tumoral, aproximadamente, após 7 dias do início do experimento e atingiram o pico em torno do 15º dia. Após esse pico, o grupo que recebeu apenas a injeção de tumor teve uma discreta queda e manteve seu crescimento em platô (403.2 ± 89.64). O grupo tratado com ácido cumárico apresentou uma queda significativa no volume tumoral (236.4 ± 89.64), sugerindo que o composto é capaz de agir em algum ponto das fases crescimento tumoral. São elas: G1 – as células sintetizam RNA e proteínas para a duplicação do DNA; S – fase de duplicação do DNA; G2 – rearranjo do material genético para a divisão (período pré-mitótico); M – fase de mitose, que culmina com a formação de, pelo menos, duas novas células (WANG *et al.*, 2017).

Figura 2 – Gráfico representativo do crescimento tumoral (em mm³) nos grupos Tumor (injeção de células B16F10 na concentração de 10⁶ células/mL e ingestão de PBS via oral) e Tumor + Cumárico (injeção de células B16F10 e tratamento com Ácido Cumárico via oral), por 26 dias



Além disso, as células mitóticas foram quantificadas através de fragmentos histológicos obtidos dos grupos de animais implantados subcutaneamente com as células do melanoma B16F10 e depois tratados ou não com o composto por 26 dias. Campos não coincidentes foram analisados. Durante a comparação desses grupos houve diferença significativa em relação à taxa de mitoses. O grupo tratado com Cumárico no decorrer do experimento apresentou uma queda no número de mitoses por campo (1.356 ± 0.2475) quando comparado com o grupo Tumor (3.486 ± 0,2475). Com isso, observou-se uma

diferença significativa na atividade mitótica entre os grupos, evidenciando um impacto do tratamento com ácido cumárico sobre as mitoses (Figura 3a e 3b).

Figura 3a - Gráfico representativo da análise da atividade mitótica. Comparação entre o grupo Tumor (n=7) que recebeu células do melanoma B16F10 na concentração de 10⁶ células/mL e foram tratados com PBS e o grupo Tumor + Cumárico (n=7) que recebeu o tratamento com o composto VO, por 26 dias. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.001$.

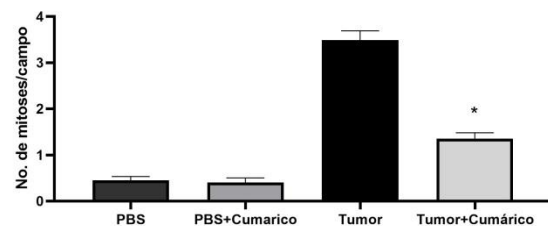
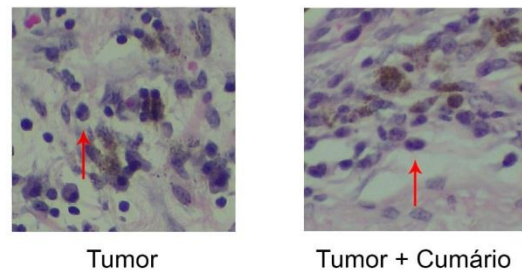


Figura 3b - Imagens representativas do corte histológico analisadas em aumento de 200x mostrando a redução da presença de mitoses.



A multiplicação celular é essencial para sobrevivência dos organismos, assim sendo, tal conceito aplica-se também à manutenção do microambiente tumoral. O crescimento do tumor e sua taxa de mitose estão intimamente relacionados, e para isso as células obedecem a uma série de etapas até sua replicação. Cada fase do ciclo celular é controlada por uma proteína (ciclina) e suas enzimas (CDK - quinases dependentes de ciclina) que ao se ligarem umas às outras enviam sinais à célula para progressão, ou não, da divisão (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). No caso do câncer de pele do tipo melanoma, esse complexo ciclina/CDK deriva da expressão de oncogenes, que são genes ligados ao desenvolvimento tumoral, das famílias RAS e BRAF que orientam o crescimento desordenado e exponencial dessas células tumorais (SANCHES; ALMEIDA; FREITAS, 2017). No presente estudo o ácido cumárico foi capaz de mostrar uma redução tanto do volume tumoral quanto da atividade mitótica. Corroborando com esse potencial efeito antitumoral, Janicke *et al.* (2011) demonstraram que o ácido p-cumárico foi capaz de reduzir a proliferação das células neoplásicas

no câncer de cólon através da modulação da expressão de genes relacionados ao ciclo celular. Genes com ação inibitória, como o CDKN1A e o CCNG2, foram superexpressos, e, oncogenes, como o MYC, foram suprimidos, culminando com o retardo da fase de transição G2/M no ciclo celular. Outro estudo acerca da ação do ácido cumárico no ciclo celular foi feito por Hu *et al.* (2020) que demonstrou que nas células da linhagem B16 o ácido p-cumárico (p-CA) diminuiu os níveis da proteína CDK2 e da ciclina E parando o ciclo na fase G0/G1, além de induzir a apoptose pela modulação das caspases 3 e 9.

Efeito do ácido cumárico na angiogênese

A formação de vasos sanguíneos, conhecida como angiogênese ou neovascularização, envolve a ramificação e extensão de vasos preexistentes, mas pode ocorrer também por recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPC) da medula óssea (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). Por facilitar o crescimento das células tumorais e modular a ação do sistema imune, a angiogênese tumoral é um importante link entre o tumor e a resposta imune direcionada a ele (KANDALAFI *et al.*, 2011), regulando-a negativamente. No presente estudo, pela análise histológica de campos não coincidentes foi observado que o grupo Tumor apresentou uma alta taxa de neovascularização (4.800 ± 0.3243). Quando analisado o grupo tratado com composto Cumárico (Tumor + Cumárico) foi relatado uma redução significativa de, aproximadamente, 49% no número de vasos sanguíneos (2.367 ± 0.3243) (Figura 4a e 4b).

Figura 4a - Gráfico representativo da atividade angiogênica. Comparação entre o grupo Tumor (n=7) que recebeu células do melanoma B16F10 na concentração de 10^6 células/mL e foram tratados com PBS e Tumor + Cumárico (n=7) que recebeu o tratamento com o composto VO, por 26 dias. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.001$.

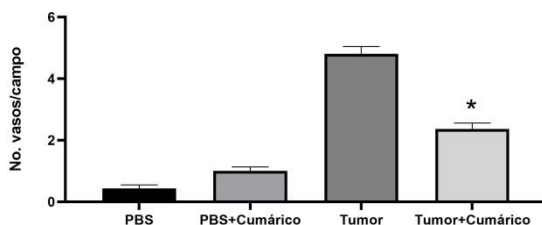
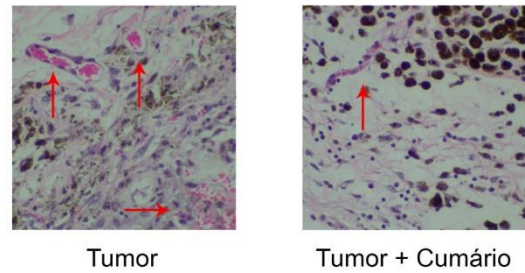


Figura 4b - Imagens representativas do corte histológico mostrando a quantificação de vasos sanguíneos.



Apesar da diversidade de fatores que participam da angiogênese, dentre eles o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento fibroblástico) e TGF- β (fator de crescimento transformador beta), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e suas diferentes isoformas (A-F), é o fator mais importante envolvido nesse processo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010). VEGF é secretado por muitos tumores em resposta ao fator induzível por hipóxia (HIF) ou por um regulamento de oncogenes como o c-MYC (OTT; HODI; BUCHBINDER, 2015). Além do seu papel na angiogênese, o VEGF modula a imunidade antitumoral em múltiplos níveis por meio da promoção de células inibitórias (Tregs), supressão da maturação de células dendríticas (DC), retardo da resposta efetora das células T e alteração do desenvolvimento e tráfico dos linfócitos (OHM; CARBONE, 2001), favorecendo o desenvolvimento do tumor. As células de melanoma produzem múltiplas citocinas e fatores de crescimento, incluindo IL-8, IL-2 e VEGF, que apresentam uma potente atividade angiogênica e pró-inflamatória e, conseqüentemente, potencializa a progressão neoplásica (GARCIA *et al.*, 2020). O tratamento com ácido cumárico nesse aspecto apresentou um desempenho positivo ao reduzir a formação de novos vasos no experimento. Levando em consideração esses dados, estudos acerca dessa possível atividade antiangiogênica do ácido cumárico são importantes.

Efeito do composto sob as células inflamatórias

A inflamação é um processo crítico que pode iniciar e / ou propagar a carcinogênese, pois, as células tumorais são capazes de produzir fatores que atraem leucócitos para o ambiente tumoral (WANG *et al.*, 2019). Há evidências experimentais de que a inflamação neutrofílica promove angiotropismo e disseminação metastática (MEDZHITOV, 2008). Portanto, no presente estudo, buscamos determinar a quantidade de células inflamatórias presentes no fragmento tecidual da lesão. Observou-se que a contagem média de macrófagos por campos não

coincidentes entre os grupos Tumor e Tumor + Cumárico não teve diferença significativa. Em relação à contagem de neutrófilos, o grupo inoculado com as células tumorais e tratado com o composto Cumárico mostrou redução significativa (17.09 ± 2.235) do recrutamento dessas células para área injuriada, quando comparado com o Grupo Tumor (26.30 ± 2.235) (Figura 6a e 6b).

Figura 6a – Gráfico representativo da análise dos neutrófilos no tecido tumoral. Quando comparado com o grupo Melanoma + Cumárico (n=7) que recebeu o tratamento com o composto por 26 dias houve uma queda significativa ($p<0,05$) do recrutamento dessas células.

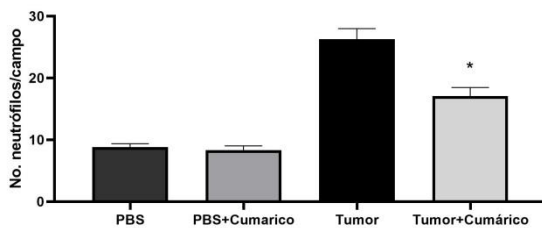
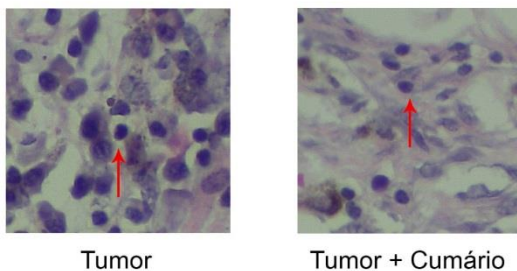


Figura 6b - Imagens representativas do corte histológico mostrando a quantificação de neutrófilos.



Sabe-se que neutrófilos ativados matam as células tumorais, porém, evidências recentes demonstraram que em alguns casos a ativação dos neutrófilos pode favorecer a progressão do tumor e das metástases através do remodelamento estromal, imparidade das células T ou mesmo estimulando a angiogênese (SINGEL; SEGAL, 2016). Fridlender *et al.* (2009) evidenciou que neutrófilos podem ser polarizados tanto em um fenótipo anti-tumorigênico (N1) pela estimulação de IFN- β (interferon-beta) quanto em um pró-tumorigênico (N2) pela ação do TGF- β (Fator de crescimento transformador-beta). Estudos recentes envolvendo tanto humanos quanto camundongos trazem dados de que os neutrófilos em tumores avançados e estabilizados são predominantemente pró-tumorigênicos, e em tumores recém-formados os TAN (neutrófilos associados ao tumor) são mais citotóxicos e produzem níveis elevados de TNF- α (fator de necrose tumoral), NO (óxido nítrico) e H₂O₂

(peróxido de hidrogênio) (MISHALIAN *et al.* 2013). Jensen *et al.* (2012) revelou que a presença de neutrófilos intratumorais está correlacionada a baixa sobrevida de pacientes com melanomas primários, pois, o ambiente pró-inflamatório é benéfico para a progressão do tumor. Em nosso estudo observamos uma redução da presença de neutrófilos na região tumoral no grupo dos animais tratados com composto Cumárico. Corroborando com esse achado, a literatura nos traz que compostos fenólicos, como o ácido p-cumárico, tem capacidade de reduzir os níveis de TNF-alfa e de radicais livres, que pode ser útil para prevenção e alívio de várias doenças crônicas causadas por estresse oxidativo, dentre elas, o câncer (BENTO-SILVA *et al.*, 2019). Levando em consideração esses fatos, pode-se inferir que o efeito anti-inflamatório demonstrado nesse estudo foi por ação do ácido cumárico.

Conclusão

A busca por novos compostos, principalmente, de origem natural, com propriedade antitumoral que tenham elevada efetividade e poucos efeitos colaterais é um campo próspero e necessário para investigação. Os extratos naturais, muito utilizados na medicina popular, ampliam horizontes em relação ao custo de produtividade e aplicabilidade. Nesse sentido, novos tratamentos para o melanoma maligno cutâneo podem ser pensados, visando associações benéficas entre as terapias convencionais e os compostos naturais. Através dessa pesquisa concluímos que o ácido cumárico, substância extraída da própolis verde brasileira, pode ter ação sobre alguns fatores que contribuem para o crescimento e progressão tumoral, como angiogênese, número de mitoses e atividade modulatória sobre certas células inflamatórias, como os neutrófilos. No entanto, estudos futuros são necessários para delimitar seus efeitos terapêuticos em células humanas, visto que fornecemos evidências sobre sua atividade em ratos.

Referências

- ASSUMPÇÃO, João Henrique Maia *et al.* Effects of Propolis and Phenolic Acids on Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines: potential involvement of epigenetic mechanisms. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 1289, 12 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25061289>.
- BAUER, Jürgen; GARBE, Claus. Acquired Melanocytic Nevi as Risk Factor for Melanoma Development. A Comprehensive Review of Epidemiological Data. **Pigment Cell Research**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 297-306, jun. 2003. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00047.x>.

BENTO-SILVA, Andreia *et al.* Factors affecting intake, metabolism and health benefits of phenolic acids: do we understand individual variability?. **European Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 1275-1293, 21 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-019-01987-6>.

BOO, Yong Chool. P-Coumaric Acid as An Active Ingredient in Cosmetics: a review focusing on its antimelanogenic effects. **Antioxidants**, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 275-291, 4 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox8080275>.

BRUNETTI, Rafael *et al.* Inhibitory effects of Euphorbia tirucalli latex on murine B16/F10 melanoma cells and lung metastasis. **Molecular And Clinical Oncology**, [S.L.], p. 511-516, 4 set. 2019. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mco.2019.1916>.

CAVALARO, Renata lara *et al.* In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. **Food Chemistry: X**, [S.L.], v. 4, p. 100054-100061, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100054>.

CHINEMBIRI, Tawona *et al.* Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment. **Molecules**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 11679-11721, 6 ago. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190811679>.

COIT, Daniel G. *et al.* Melanoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal Of The National Comprehensive Cancer Network**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 450-473, abr. 2016. Harborside Press, LLC. <http://dx.doi.org/10.6004/jnccn.2016.0051>.

FRIDLENDER, Zvi G. *et al.* Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 183-194, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>

GARCIA, Nathalia Prata *et al.* Antitumoral Effect of Lobelia Inflata in An Experimental Mouse Model of Melanoma. **Biomedical Journal Of Scientific & Technical Research**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 18856-18864, 30 jan. 2020. Biomedical Research

Network, LLC. <http://dx.doi.org/10.26717/bjstr.2020.25.004154>.

HU, Xue *et al.* The Anti-tumor Effects of p-Coumaric Acid on Melanoma A375 and B16 Cells. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 10, 16 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.558414>.

IRENO, Layene C *et al.* Evaluation of the Lobelia inflata Extract in the Histopathological Profile of Melanoma in Experimental Model. **Biomedical Journal Of Scientific & Technical Research**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 19927-19934, 6 mar. 2020. Biomedical Research Network, LLC. <http://dx.doi.org/10.26717/bjstr.2020.26.004348>.

JANICKE, Birgit *et al.* The Antiproliferative Effect of Dietary Fiber Phenolic Compounds Ferulic Acid and p-Coumaric Acid on the Cell Cycle of Caco-2 Cells. **Nutrition And Cancer**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 611-622, 14 abr. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2011.538486>.

JENSEN, Trine O. *et al.* Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. **Cancer**, [S.L.], v. 118, n. 9, p. 2476-2485, 22 set. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.26511>.

KANDALRAFT, Lana E. *et al.* Angiogenesis and the Tumor Vasculature as Antitumor Immune Modulators: the role of vascular endothelial growth factor and endothelin. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, [S.L.], p. 129-148, 2010. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/82_2010_95.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010;

LEONARDI, Giulia *et al.* Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (review). **International Journal Of Oncology**, [S.L.], p. 1071-1080, 27 fev. 2018. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>.

LIMA, Luiza Dc *et al.* Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 177, 29 maio

2014. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-177>.

MATARRESE, Paola *et al.* Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: an in vitro and in vivo study. *Molecular Cancer*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 207-220, 2010. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-9-207>.

MATTIA, Gianfranco *et al.* Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death & Disease*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1-14, 25 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-017-0059-7>.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, [S.L.], v. 454, n. 7203, p. 428-435, jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature07201>.

MISHALIAN, Inbal *et al.* Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, [S.L.], v. 62, n. 11, p. 1745-1756, 4 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00262-013-1476-9>.

NASCIMENTO, Bruno A. C. *et al.* Arctium lappa Extract Suppresses Inflammation and Inhibits Melanoma Progression. *Medicines*, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 81-90, 29 jul. 2019. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/medicines6030081>.

OHM, Joyce E; CARBONE, David P. VEGF as a Mediator of Tumor-Associated Immunodeficiency. *Immunologic Research*, [S.L.], v. 23, n. 2-3, p. 263-272, 2001. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1385/ir:23:2-3:263>.

OTT, Patrick A.; HODI, F. Stephen; BUCHBINDER, Elizabeth I.. Inhibition of Immune Checkpoints and Vascular Endothelial Growth Factor as Combination Therapy for Metastatic Melanoma: an overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data. *Frontiers In Oncology*, [S.L.], v. 5, 22 set. 2015. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2015.00202>.

OVERWIJK, Willem W.; RESTIFO, Nicholas P.. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current Protocols In Immunology*, [S.L.], v. 39, n. 1, out. 2000. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>.

SANCHES, Maria Mendonça; ALMEIDA, Luís Soares de; FREITAS, João Pedro. Genes e Melanoma. *Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia*, Lisboa, v. 75, n. 3, p. 231-238, 10 jun. 2017.

SINGEL, Kelly L.; SEGAL, Brahm H.. Neutrophils in the tumor microenvironment: trying to heal the wound that cannot heal. *Immunological Reviews*, [S.L.], v. 273, n. 1, p. 329-343, 25 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12459>.

SOUMOY, Laura *et al.* Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Melanoma. *Cancers*, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 529-539, 12 abr. 2019. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/cancers11040529>.

WANG, Jing *et al.* Crosstalk between cancer and immune cells: role of tumor associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Medicine*, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 4709-4721, 20 jun. 2019. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/cam4.2327>.