



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA

CAMILA DE CARVALHO JUANES

**PRÓPOLIS VERMELHA E L-LISINA INIBINDO ANGIOGÊNESE NO TUMOR DE
WALKER EM MODELO DE BOLSA JUGAL DE HAMSTER**

FORTALEZA

2018

CAMILA DE CARVALHO JUANES

PRÓPOLIS VERMELHA E L-LISINA INIBINDO ANGIOGÊNESE NO TUMOR DE
WALKER EM MODELO DE BOLSA JUGAL DE HAMSTER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Conceição Aparecida Dornelas.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- J82p Juanes, Camila de Carvalho Juanes.
PRÓPOLIS VERMELHA E L-LISINA INIBINDO ANGIOGÊNESE NO TUMOR DE WALKER
EM MODELO DE BOLSA JUGAL DE HAMSTER / Camila de Carvalho Juanes Juanes. –
2018.
121 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Conceição Aparecida Domelas.
1. Neovascularização. 2. Própolis Vermelha. 3. L-lisina. I. Título.

CDD 571.9

CAMILA DE CARVALHO JUANES

PRÓPOLIS VERMELHA E L-LISINA INIBINDO ANGIOGÊNESE NO TUMOR DE
WALKER EM MODELO DE BOLSA JUGAL DE HAMSTER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Conceição Aparecida Dornelas (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

Prof. Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Agradeço a Deus, por ser a fonte da vida.

Agradeço aos meus pais, Alberto Juanes
Garcia e Cristina Ferreira de Carvalho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Conceição Aparecida Dornelas, Professora Adjunta IV do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal (UFC), pela excelente orientação, por ter acompanhado cada etapa da pesquisa.

Aos professores participantes da banca examinadora por ter aceito participar da banca e pela valiosa contribuição na avaliação do meu trabalho.

Ao Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru, pela generosidade e apoio profissional na avaliação estatística dos dados do estudo e pelo espaço em seu laboratório de Farmacologia Pré-clínica.

À Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, pela orientação e colaboração na extração da própolis vermelha no Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. À Doutoranda Gisele Aguiar Rocha por toda sua disposição em conduzir e auxiliar os procedimentos de extração da própolis vermelha.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho e ao Doutorando Francisco Stefânio Barreto, do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, por toda contribuição no fornecimento das células tumorais

À Nayanna Melo Oliveira, Vanessa Lages Braga e Susana Moreira de Souza pelo companheirismo, pela amizade, por toda a ajuda durante o mestrado.

À Adriele Machado, Ana karoline Alves Costa, Carla Lays Lima e Silva, Carol Anne Fernandes, Clara Diniz, Hélio de Souza Peres Júnior, Jefferson Matheus da Costa Freire, Jocélia Holanda Félix, José Robson de Sousa, Kleison Douglas Gomes Pimentel, Sarah Edsa Rodrigues Martins pela valiosa ajuda nos procedimentos experimentais.

Ao corpo docente do mestrado pela dedicação ao mestrado e compromisso na formação dos alunos.

À Valeria Oliveira, secretária da Pós-graduação em Patologia, por seu empenho em cuidar dos alunos e dos assuntos da Pós-graduação em Patologia.

Ao Sr. Bento Francisco de Oliveira por sua contribuição no cuidado dos animais de laboratório. À Francisco Deomar Maciel, técnico da EBSERH, pelo processamento das amostras experimentais.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros preexistentes. É um processo que participa da progressão do câncer. Também desempenha um papel fundamental em outras doenças, como retinopatia diabética e artrite reumatoide. Neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos da própolis vermelha e da *L*-lisina na angiogênese tumoral e no carcinossarcoma de Walker inoculado em bolsa jugal de hamster. Foram utilizados 57 animais divididos em oito grupos. Os grupos I, II, III e IV (própolis vermelha – 200 mg/5ml/kg -, *L*-lisina – 150 mg/kg -, goma arábica 1% - 5 ml/kg - e água - 5 ml/kg -, respectivamente) foram tratados por dez dias após o inóculo do tumor. Os grupos V, VI, VII e VIII (própolis vermelha – 200 mg/5 ml/kg, *L*-lisina 150 mg/kg, goma arábica 1% - 5 ml/kg e água 5 ml/kg, respectivamente) receberam as substâncias por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral. A angiogênese foi avaliada por meio da determinação da área vascular média A_{Vm} , em pixels (px) e em termos percentuais (%). O tamanho do tumor foi avaliado por meio da determinação da área (A_{Tu}) e perímetro tumoral (P_{Tu}) em plano único. No estudo dos grupos I, II, III e IV, a A_{Vm} (px e %) do grupo I ($p < 0,05$) e do grupo II ($p < 0,001$) foi significativamente menor do que A_{Vm} do grupo IV. No estudo dos grupos V, VI, VII e VIII, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nem para os valores de A_{Vm} (px) ($F = 1,6958$; $p = 0,1957$), tampouco para os valores de A_{Vm} (%) ($F = 1,6957$; $p = 0,1958$). Na avaliação dos grupos I, II, III e IV, não houve diferença estatisticamente significantes entre os grupos nem para os valores de A_{Tu} ($F = 1,6231$; $p = 0,2156$), tampouco para P_{Tu} ($F = 0,7818$; $p = 0,5180$). Também, na comparação entre os grupos V, VI, VII e VIII, não houve diferença estatisticamente significantes entre os grupos para os valores de A_{Tu} ($F = 1,3891$; $p = 0,2713$) e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre grupos experimentais e seus controles para valores de P_{Tu} . A própolis e a *L*-lisina, quando administradas após o inóculo tumoral, nas doses e tempos administrados, inibiram a angiogênese tumoral.

Palavras-chave: Neovascularização. Própolis Vermelha. *L*-lisina.

ABSTRACT

Angiogenesis is the formation of new blood vessel from pre-existing vessels. Angiogenesis is a process that takes part in the progression of cancer. It also plays a role in several diseases, including diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis. This study, aimed to evaluate the propolis and *L*-lysine effect in tumor angiogenesis and Walker carcinosarcoma in hamster cheek pouch. Fifty-seven animals were divided into eight groups. The groups I, II, III and IV (red propolis – 200 mg/5 ml/kg -, *L*-lysine – 150 mg/kg -, arabic gum 1% - 5 ml/kg - and water - 5 ml/kg -, respectively) were treated ten days after tumor inoculation. The groups V, VI, VII and VIII (red propolis – 200 mg/5 ml/kg -, *L*-lysine – 150 mg/kg -, arabic gum 1% - 5 ml/kg - and water - 5 ml/kg -, respectively) were treated 33 days before and ten days after tumor inoculation. The angiogenesis was assessed by determining the mean vascular area A_{Vm} , in pixels (px) and percentage terms (%). The size of the tumor was assessed by determining the tumor area (A_{Tu}) and perimeter (P_{Tu}) in a single plane. The A_{Vm} (px and %) of group I ($p < 0,05$) and of group II ($p < 0,001$) was significantly lower than in of group IV. There was no significant differences of A_{Vm} (px) ($F = 1,6958$; $p = 0,1957$) and A_{Vm} (%) ($F = 1,6957$; $p = 0,1958$) between the groups V, VI, VII and VIII. There was no significant difference of A_{Tu} ($F = 1,6231$; $p = 0,2156$) and P_{Tu} ($F = 0,7818$; $p = 0,5180$) between the groups I, II, III and IV. There was no significant differences of A_{Tu} ($F = 1,3891$; $p = 0,2713$) between the groups V, VI, VII e VIII, and there was no significant difference of P_{Tu} between experimental and control groups. Propolis and *L*-lysine inhibited tumor angiogenesis, when given after the tumor inoculation, at the doses and times administered.

Keywords: Neovascularization. Red propolis. *L*-lysine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– As marcas do câncer	24
Figura 2	– Desenho experimental	45
Figura 3	– A – Bolsa jugal de hamster evertida e limpa. B – Inóculo de suspensão de células tumorais de Walker na bolsa jugal. C – Inóculo finalizado medindo menos de 1,0 cm	46
Figura 4	– A – Própolis vermelha <i>in natura</i> . B – Própolis vermelha triturada. C – Extrato etanólico de propólis vermelha. D – Extrato de propólis evaporando o álcool em rota-evaporador. E – Extrato de propólis concentrado após passar pelo rota-evaporador. F – Extrato de propólis após banho-maria. G - Extrato aquoso de propólis vermelha.	47
Figura 5	– A – Estrutura para o procedimento de ressecção e fotografia do tumor. B – Bolsa jugal com tumor de Walker. C – Cauterização de vasos e ressecção da bolsa jugal com bisturi elétrico. D – Abertura lateral da bolsa jugal para montagem. E – Montagem a fresco do tecido em plano branco. F – Observação do tumor com microscópio estereoscópico	49
Figura 6	– A - Angulação da objetiva do microscópio cirúrgico. B – Objetiva formando ângulo de 70° com o plano horizontal	50
Figura 7	– A – Fotomicrografia do tumor em bolsa jugal panorâmica (aumento 10x). B, C, D, E – Fotomicrografias dos quadrantes (aumento 16x)	51
Figura 8	– A, B, C, D - Quantificação da área de vascularização dos quadrantes a partir das imagens digitais (aumento 16x) com o software SQAN (Sistema de Quantificação de Angiogênese) ...	52
Figura 9	– Ambiente ImageJ/Fiji	53
Figura 10	– Calibração da escala traçando uma linha com a ferramenta “ <i>straight*</i> ” sobre uma distância conhecida	54
Figura 11	– Área tumoral contornada com a ferramenta <i>Freehand selections</i> e medidas selecionadas	54
Figura 12	– Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em pixels, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral	57
Figura 13	– Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em termos percentuais, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral	57
Figura 14	– Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em pixels, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	58
Figura 15	– Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em termos percentuais, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	59

Figura 16	– Área tumoral (A_{Tu}), expressa em mm^2 , dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral	60
Figura 17	– Perímetro tumoral (P_{Tu}), expresso em mm, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral	61
Figura 18	– Área tumoral (A_{Tu}), expressa em mm^2 , dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	62
Figura 19	– Perímetro tumoral (P_{Tu}), expresso em mm, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	63
Figura 20	– Variação de peso corporal, em termos percentuais, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral	115
Figura 21	– Variação de peso corporal, em termos percentuais, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	115
Figura 22	– Carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Área vascular média (A_{Vm}) dos quatro quadrantes, expressa em pixels (px) e em termos percentuais (%), dos grupos da própolis (I), <i>L</i> -lisina (II), goma arábica (III) e água (IV), tratados por dez dias após o inóculo tumoral	57
Tabela 2	– Área vascular média (A_{Vm}) dos quatro quadrantes, expressa em pixels (px) e em termos percentuais (%), dos grupos da própolis (V), <i>L</i> -lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII), tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	59
Tabela 3	– Área tumoral (A_{Tu}) e perímetro tumoral (P_{Tu}), expressos em mm^2 e mm, respectivamente, dos grupos da própolis (I), <i>L</i> -lisina (II), goma arábica (III) e água (IV), tratados por dez dias após o inóculo tumoral	60
Tabela 4	– Área tumoral (A_{Tu}) e perímetro tumoral (P_{Tu}), expressos em mm^2 e mm, respectivamente, dos grupos da própolis (V), <i>L</i> -lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII), tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	63
Tabela 5	– Variação de peso corporal (ΔP_c) e peso relativo do pulmão (P_P), fígado (P_F) e baço (P_B), dos grupos da própolis (I), <i>L</i> -lisina (II), goma arábica (III) e água (IV), tratados por dez dias após o inóculo tumoral	64
Tabela 6	– Variação de peso corporal (ΔP_c) e peso relativo do pulmão (P_P), fígado (P_F) e baço (P_B), dos grupos da própolis (V), <i>L</i> -lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII), tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral	65
Tabela 7	– Causas de exclusão de animais dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII	102
Tabela 8	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo da própolis vermelha (I)	103
Tabela 9	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo da <i>L</i> -lisina (II)	104
Tabela 10	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo da goma arábica (III)	105
Tabela 11	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo da água (IV)	106
Tabela 12	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo da própolis vermelha (V)	107
Tabela 13	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo <i>L</i> -lisina (VI)	108
Tabela 14	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo goma arábica (VII)	109
Tabela 15	– Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo da água (VIII)	110

Tabela 16	– Valores da área e perímetro tumoral de cada animal do estudo dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII	111
Tabela 17	– Peso corporal individual semanal dos animais dos grupos da própolis (I), <i>L</i> -lisina (II), goma arábica (III) e água (IV)	112
Tabela 18	– Peso corporal individual semanal dos animais dos grupos da própolis (V), <i>L</i> -lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII)	113
Tabela 19	– Peso do pulmão, fígado e baço individual dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, no último dia de experimento	114
Tabela 20	– Média de ingesta semanal dos grupos da própolis (I), <i>L</i> -lisina (II), goma arábica (III) e água (IV)	116
Tabela 21	– Média de ingesta semanal dos grupos de prevenção da própolis (V), <i>L</i> -lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII)	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estudos com ratos inoculados com carcinossarcoma de Walker 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

213Bi-DOTATATE	²¹³ Bismuto-DOTA-Try ³ -octroyotata
3T3-L1	Linhagem de pré-adipocitos de camundongo
ABCA-1	Transportador A1 com cassete de ligação ao ATP (<i>ATP-binding Cassette Transporter A1</i>)
a.C.	Antes de Cristo
AGE	Produtos finais da glicação avançada
Akt	Proteína quinase B
ARC	Artepillin C
ATP	Adenosina trifosfato
ANOVA	Análise de variância
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
BBN	N-butil-(-4-hidroxibutil)nitrosamina
C57BL/6	Camundongo isogênico
CAM	Membrana corioalantoica
CAPE	Ester fenético de ácido caféico
CCL28	Quimiocina motivo C-C ligante 28
CCR3	Receptor de quimiocina CC3
CD-31	Cluster de diferenciação 21, PECAM-1
CE	Células endoteliais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cdc42	Proteína homóloga de controle da divisão celular 42
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPG	<i>Central pattern generating</i> , gerador de padrão central
CPPC	Câncer de pulmão de pequenas células
CTC	Células tumorais circulantes
CXCL ₁	Quimiocina motivo C-X-C ligante 1
CXCL ₂	Quimiocina motivo C-X-C ligante 2
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila

FAMED	Faculdade de Medicina
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
HbA1c	Hemoglobina A1c
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma de cólon humano
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDAC-1	Histona desacetilase-1
HeK-293	Linhagem de células de rim de embrião humano normal
Hep-2	Células de carcinoma epidermoide de laringe humana
HEXred	Fração de <i>n</i> -hexano da própolis vermelha brasileira
HIF-1	Fator induzido por hipóxia-1
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia-1 α
HIF-1 β	Fator induzido por hipóxia-1 β
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica humana
HPCL	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSP70	Lipoproteína de choque térmico 70 (KDa)
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IG	Indicação geográfica
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina-1
IL-6	Interleucina-6
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial Brasileiro
K562	Linhagem celular de linfoblastoide humano derivado de paciente com leucemia mieloide crônica
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
LBPN	Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
LPS	Lipopolisacarídeo bacteriano
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	Proteína quinase ativada por mitôgeno
mBSA	Albumina sérica bovina metilada
MCF-7	Linhagem de células de câncer de mama humano
MEUS	Microbubble-enhanced ultrasound

MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago-2
MMP	Metaloproteinase
MMP-9	Metaloproteinase-9
MNNG-HOS	Linhagem de células de osteosarcoma humano
MSM-CPM	<i>memAgent-Spring computational model- cellular Potts model</i>
MS (análise)	Label-free quantitativa MS-based proteomic plataforma
NCI-H446	Linhagem de células de câncer de pulmão de pequenas células humano
NF-κB	Fator nuclear-Capa B
NK	Natural Killer
OVCAR-8	Linhagem de células de carcinoma de ovário humano
p38 MAPK	p38 MAP quinase
PCL- γ	Fosfolipase C- γ
PCH	Padrões de crescimento histopatológico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEA	Percutaneous ethanol ablation
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PIGF	Fator de crescimento placentário
PPB	Benzofenona poliprenilada
PPAR-γ	Receptor nuclear gama ativado por proliferadores de peroxissomos-γ
PVB	Própolis vermelha brasileira
pVHL	Degradação proteosmal dependente de von Hippel-Lindau
RD	Linhagem de células de rabdomyosarcoma humano
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI-8226	Linhagem de células de mieloma humano
RT-PCR	Transcrição reversa-reação em cadeia de polimerase
SAMP-8	Senescece-accelerated mouse prone 8
SF-295	Linhagem de células de glioblastoma humano
SQAN	Sistema de quantificação da angiogênese

TAT	Terapia alfa visada
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
THP-1	Linhagem celular de monócitos humanos derivados de pacientes com leucemia
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TSP-1	Trombospodina-1
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFC	Universidade Federal do Ceará
u-PA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
U-2OS	Linhagem de células de osteossarcoma humano
VE-caderina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular-A
VEGFR-1	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular-1
VEGFR-2	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular-2
VEGFR-3	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular-3

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
<	Menor do que
>	Maior do que
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
%	Porcentagem ou percentagem
°C	Graus Célsius
®	Marca Registrada
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
K	Capa
μ	Micro
μM	Micromolar
A _{Vm}	Área vascular média
A _{Tu}	Área tumoral
bmp	Formato bitmap (extensão de arquivo)
Ca	Cálcio
C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ .HCl	L-lisina monoclóridato
Cu	Cobre
DP	Desvio-padrão
EAG	Equivalência de ácido gálico
F	Estatística de Fisher-Snedecor
Fe	Ferro
g	Gramas
IC50	Concentração inibitória máxima 50%
K	Potássio
Kg	Kilograma
L	Litro
LD50	Dose letal mediana
mm	Milímetro

mm²	Milímetro quadrado
min	Minuto
ml	Mililitro
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
n	Tamanho (Nº de elementos da amostra)
NO	Oxido nítrico
p	Probabilidade de significância
P	Proporção
P_{Tu}	Perímetro tumoral
px	Píxel

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	A relevância da angiogênese para o crescimento e progressão tumoral	21
1.2	Controvérsias nas terapias antiangiogênicas contra o câncer	27
1.3	Como a Própolis Vermelha Brasileira pode ajudar?	29
1.4	<i>L</i> -lisina, um aminoácido essencial na alimentação e nas pesquisas	35
1.5	Carcinossarcoma de Walker 256: modelo para o estudo da angiogênese	38
1.6	Modelo de bolsa jugal de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	41
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivos Gerais	43
2.2	Objetivos Específicos	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	Protocolo experimental e cuidados animais	44
3.2	Células tumorais de Walker e inóculo em bolsa jugal de hamster	45
3.3	Preparo e administração de <i>L</i> -lisina e extrato de própolis vermelha	46
3.4	Captura de imagem para quantificação da angiogênese e do tamanho tumoral	48
3.5	Área de vascularização	50
3.6	Área e perímetro tumoral	53
3.7	Variação de peso corporal	54
3.8	Peso relativo dos órgãos	55
3.9	Estatística	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Exclusão de animais	56
4.2	Avaliação da angiogênese tumoral	56
4.2.1	Área de vascularização dos grupos I, II, III, IV	56
4.2.2	Área de vascularização dos grupos V, VI, VII e VIII	58
4.3	Avaliação do tamanho tumoral	60
4.3.1	Área e perímetro tumoral dos grupos I, II, III, IV	60
4.3.2	Área e perímetro tumoral dos grupos V, VI, VII e VIII	62
4.4	Variação de peso corporal e peso relativo dos órgãos	64

5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A – ESTUDO PILOTO DO INÓCULO TUMORAL	101
	APÊNDICE B – TABELA DE EXCLUSÃO	102
	APÊNDICE C – ÁREA VASCULAR DO IMPLANTE TUMORAL	103
	APÊNDICE D – ÁREA E PERÍMETRO TUMORAL	111
	APÊNDICE E – PESO CORPORAL	112
	APÊNDICE F – PESO DO PULMÃO, FÍGADO E BAÇO	114
	APÊNDICE G – VARIAÇÃO DE PESO	115
	APÊNDICE H – INGESTA DE SUBSTÂNCIAS	116
	APÊNDICE I – HISTOLOGIA DE CARCINOSSARCOMA DE WALKER EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER	117
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA-UFC)	118
	ANEXO B – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA L-LISINA	119
	ANEXO C – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA GOMA ARÁBICA	120
	ANEXO D – COMPOSIÇÃO E OUTRAS INFORMAÇÕES DA RAÇÃO CONSUMIDA PELOS ANIMAIS	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 A relevância da angiogênese para o crescimento e progressão tumoral

Angiogênese ou neovascularização é definida como um processo que consiste na geração de novos vasos sanguíneos a partir de outros preexistentes (FOLKMAN, 1995). O termo angiogênese foi citado pela primeira vez no título de um artigo científico, por Flint, em 1900, ao descrever a vascularização da glândula adrenal. Existem, no entanto, muitas controvérsias sobre a origem do vocábulo e acerca de quem o citou pela primeira vez. O cirurgião britânico John Hunter (1728-1793) foi apontado como o primeiro a utilizar a palavra, porém sabe-se que, em seu tratado *Treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds* (1794), descreveu o crescimento de novos vasos sanguíneos, todavia não utilizou um neologismo para denominá-lo (LENZI; BOCCI; NATALE, 2016). Posteriormente, Judah Folkman foi considerado o ‘pai da angiogênese’ pela relevância de suas pesquisas com angiogênese, especialmente, angiogênese em neoplasias (STEPHENSON *et al.*, 2013).

Durante a embriogênese, o desenvolvimento do sistema vascular envolve o surgimento de células endoteliais e sua formação em tubos (vasculogênese) em adição ao brotamento (angiogênese) de novos vasos a partir dos já existentes. Durante a vida adulta, embora possa ocorrer naturalmente no sistema reprodutivo feminino (KLAGSBRUN; D’AMORE, 1991), durante a ovulação, menstruação, implantação e gravidez (HANAHAN; FOLKMAN, 1996), inflamação e reparo tecidual, a angiogênese é um evento raro, já que o endotélio da maioria dos tecidos é composto por uma população de células demasiado estável, com baixa atividade mitótica (HALL, 2005).

A resposta angiogênica é limitada e rigorosamente controlada, sendo ativada por um breve período e, em seguida, completamente inibida (FOLKMAN, 1995). Certas doenças, porém, como retinopatia diabética e artrite reumatoide, provocam a ativação e a persistência do estímulo da angiogênese, tornando-se esse evento responsável pela progressão da doença. Além disso, a angiogênese é um requisito para o crescimento de tumores sólidos e metástase (FOLKMAN, 2007). O crescimento anormal de vasos sanguíneos, de maneira excessiva ou insuficiente, é reconhecido pela literatura científica como um “denominador comum” de muitas

doenças mortais e debilitantes, incluindo o câncer, doenças de pele, degeneração macular, úlceras em diabéticos, doenças cardiovasculares, derrame e outras, sendo mais de 70 doenças, sem incluir todos os tipos de câncer (STEPHENSON *et al.*, 2013).

A importância do estudo da angiogênese decorre da necessidade de estabelecer tratamentos antiangiogênicos para doenças que têm progressão pela angiogênese, como o câncer, ou tratamentos pró-angiogênicos, visando a doenças com deficiência no crescimento de vasos sanguíneos, como processos isquêmicos. Encontrar novos agentes anti ou pró-angiogênicos, que expressem segurança e eficiência na sua administração, com baixa toxicidade e baixo custo é o alvo de muitas pesquisas na área médica, principalmente na oncologia.

Uma similaridade entre células tumorais e normais é a necessidade por suprimento adequado de oxigênio, de nutrientes e de um meio para remoção de resíduos metabólico e dióxido de carbono. Um tumor pode induzir o crescimento de novos vasos pela ação de várias moléculas, que podem ser comuns à angiogênese normal (PAPETTI; HERMAN, 2002).

Em tecidos normais, o crescimento vascular é equilibrado com as necessidades celulares, enquanto, por falta de tal equilíbrio, tecidos neoplásicos contêm espaços avasculares e hipóxicos, que estimulam a ativação da angiogênese (JAIN, 2003). Vasos sanguíneos tumorais perdem a capacidade de tornarem-se quiescentes, contribuindo para o crescimento desequilibrado de novos vasos (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

A angiogênese ativada cronicamente em tumores por uma mistura desbalanceada de sinais pró-angiogênicos resulta em neovascularização marcada por brotamento capilar precoce, ramificações de vasos excessivos, tortuosos e largos, fluxo sanguíneo irregular, micro-hemorragias, extravasamentos e níveis anormais de proliferação e apoptose de células endoteliais (BALUK; HASHIZUME; McDONALD, 2005).

Além disso, os vasos tumorais mostram-se bastante heterogêneos e diferem dos vasos normais em sua estrutura, organização e função (NAGY *et al.*, 2010). Também foram identificadas em vasos tumorais proteínas de superfície celular e de matriz extracelular não expressas ou pouco expressas em vasos normais. Muitas dessas proteínas estão envolvidas com angiogênese (RUOSLAHTI; BHATIA; SAILOR, 2010). Células endoteliais em tumores diferem de células endoteliais normais também no perfil de expressão genética, em razão de suas anormalidades

citogenéticas, como aneuploidias e centrossomos anormais, que geram instabilidade genética, e como consequência podem resultar em resistência a drogas antiangiogênicas (HIDA; TORII; HIDA, 2016).

Outra característica das células endoteliais é que, além de coordenarem migração e proliferação em resposta à ativação de fator de crescimento, elas também coordenam seu metabolismo e adaptam seu fluxo metabólico para o aumento de demanda de energia e de biomassa para o brotamento de novos vasos. O metabolismo das células endoteliais também participa da transdução do sinal angiogênico, e alterações em suas vias metabólicas podem afetar a morfogênese dos vasos (POTENTE; CARMELIET, 2017).

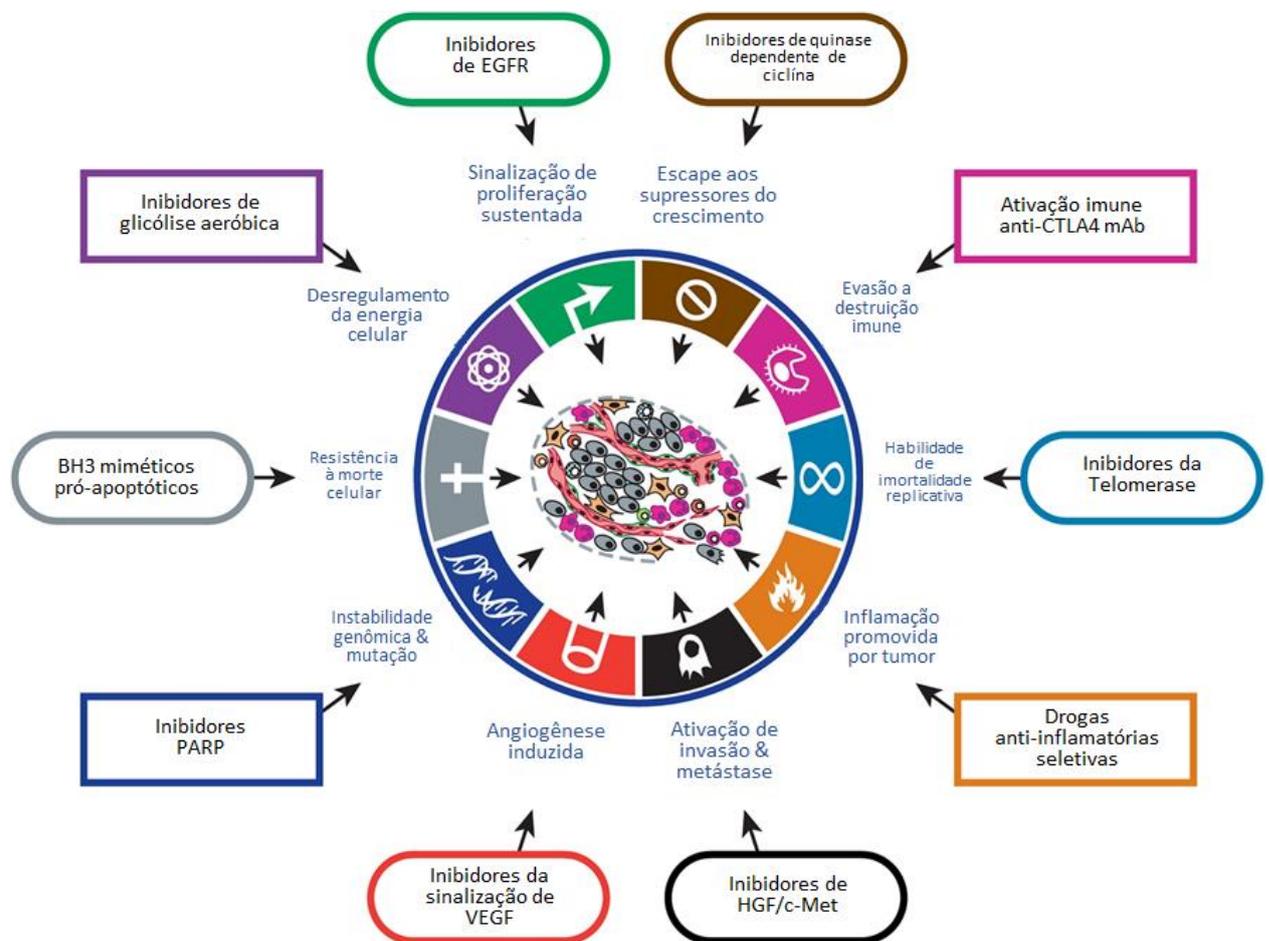
Uma vez que a angiogênese foi ativada, tumores exibem diversos padrões de neovascularização. Adenocarcinomas de ducto pancreático, por exemplo, são hipovascularizados e constituídos por estroma tumoral avascular, que, quando diminuído, tal redução resultou no aumento da angiogênese, sugerindo a atividade antiangiogênica do estroma (OLIVE *et al.*, 2009). Muitos outros tumores, como carcinomas neuroendócrinos pancreáticos e tumores genitourinários humanos, são altamente angiogênicos e densamente vascularizados (TURNER *et al.*, 2003; ZEE *et al.*, 2010).

Por sua relevância para a patogênese tumoral, a angiogênese é considerada marca registrada do câncer. As características comuns às neoplasias em humanos foram organizadas e descritas no estudo *The hallmarks of cancer* (HANAHAN; WEINBERG, 2011), que compreende seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de tumores humanos (Figura 1). Uma dessas características é a indução da angiogênese e as demais são a sinalização de proliferação sustentada, o escape a supressores de crescimento, a resistência à morte celular, a habilidade de imortalidade replicativa e a ativação de invasão e metástase. Além dessas características, estão a instabilidade genômica e a mutação, gerando a diversidade genética e acelerando a aquisição de outras marcas do câncer, e inflamação promovida pelo tumor, que, por sua vez, promove outras marcas do câncer. Também foram discutidos, pelos autores, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão à destruição imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Nesse contexto, há alguns aspectos relevantes para a fisiologia do tumor relacionados a angiogênese que são importantes: a gradação da ativação da angiogênese durante a progressão tumoral; os inibidores angiogênicos endógenos

como barreiras naturais para a angiogênese tumoral; os perícitos como componentes importantes para a neovascularização tumoral; e a variedade de células derivadas da medula óssea que contribuem para a angiogênese tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 - As marcas do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Durante a progressão tumoral, o 'ativador angiogênico' está quase sempre ativado e permanece ativado, fazendo com que o tecido vascular, normalmente quiescente, continue brotando novos vasos que sustentam o crescimento do tecido neoplásico (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Esse 'interruptor angiogênico' é regulado por fatores compensatórios que ora induzem ora inibem a angiogênese (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009; BERGERS; BENJAMIN, 2003). Alguns desses reguladores

(estimuladores ou inibidores) angiogênicos são proteínas de sinalização que se ligam a receptores de superfície celular exibidos por células endoteliais.

A ativação da angiogênese inicia-se discretamente durante o desenvolvimento do tumor e aumenta com a progressão tumoral, sendo controlada por um complexo biológico que envolve tanto o fenótipo das células cancerosas como o microambiente associado (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009; BERGERS; BENJAMIN, 2003). Foi observado, com apoio na análise da densidade microvascular, que a angiogênese é induzida em estádios pré-neoplásicos, em modelos animais e também em humanos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Análises histológicas de lesões pré-malignas e não invasivas, incluindo displasias e carcinomas *in situ* em vários órgãos, mostraram a ativação precoce da angiogênese (RAICA; CIMPEN; RIBATTI, 2009), indicando que angiogênese também contribui para a progressão neoplásica, desde a fase pré-maligna microscópica.

O mecanismo de ativação da angiogênese pode variar, mesmo que resulte na ativação de um sinal indutor comum. Em alguns tumores, oncogenes dominantes, tais como Ras e Myc (reguladores de sinais proliferativos), controlam o aumento da expressão de fatores pró-angiogênicos, enquanto que, em outros, a indução da angiogênese pode ser iniciada indiretamente por células inflamatórias. Isso demonstra que distintas características do câncer podem ser co-reguladas por um mesmo agente transformador (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O estimulador de angiogênese mais conhecido é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) –A. O gene VEGF-A codifica ligantes que estão envolvidos no processo de angiogênese no desenvolvimento embrionário e pós-natal, na sobrevivência e homeostase de células endoteliais, em situações fisiológicas e patológicas. A sinalização de VEGF é regulada por três receptores (tirosino-quinase) de fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) -1, -2 e -3. A regulação da expressão de VEGF pode aumentar tanto por hipóxia como por sinalização de oncogenes (FERRARA, 2009; MAC GABHANN; POPEL, 2008). Além disso, VEGF está na matriz extracelular e pode ser liberado e ativado por proteases degradadoras de matriz extracelular, como metaloproteinase (MMP) -9 (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Outros sinais pró-angiogênicos, como fator de crescimento fibroblástico (FGF) -1 e -2, sustentam angiogênese tumoral quando sua expressão está aumentada. Também são pró-angiogênicos o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) -B e -C e angiopoietinas (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009).

Inibidores endógenos da angiogênese são uma barreira natural para angiogênese tumoral. Muitos desses inibidores são proteínas e muitos são derivados de clivagem proteolítica de proteínas estruturais não reguladoras da angiogênese. Alguns desses inibidores endógenos foram testados em terapias antiangiogênicas (FOLKMAN, 2002, 2006; NYBERG; XIE; KALLURI, 2005; RIBATTI, 2009;). Trombospodina (TSP-1), um dos inibidores da angiogênese mais conhecidos, liga-se aos receptores em células endoteliais e tem efeito direto na migração e sobrevivência dessas células (KAZEROUNIAN; YEE; LAWLER, 2008). Outros inibidores endógenos são endostatina, canstatina, tumstatina, interferon (IFN) $-\alpha$ e $-\beta$ e angiostatina (BAERISWYL; CHRISTOFORI, 2009).

Outras vias de sinalização interconectadas envolvendo ligantes de receptores de transdução de sinal exibidos por células endoteliais, como Notch, Neuropilin, Robo, netrin, Eph-A/B, também participam da angiogênese associada a tumor (AHMED; BICKNELL, 2009; CARMELIET; JAIN, 2000; PASQUALE, 2010).

Componentes, também importantes da neovascularização tumoral são os perícitos, que são células justapostas à superfície externa do endotélio com importante função de suporte mecânico e fisiológico para as células endoteliais, também presentes em tecido vascular normal. Na vascularização associada a tumores, estudos mostraram que perícitos estão envolvidos com a neovascularização da maioria, se não de todos, os tumores (FERLAND-McCOLLOUGH *et al.*, 2017; RAZA; FRANKLIN; DUDEK, 2010; RIBATTI, 2011). Os vasos tumorais podem diferir na morfologia e na cobertura por perícitos em variados tipos de tumores, em distintos estádios de progressão, com diferenças entre tumores altamente metastáticos e tumores pouco metastáticos, de modo que vasos formados em tumores altamente metastáticos são imaturos e com pouca cobertura por perícitos, se comparados com tumores com menor potencial metastático (HIDA; TORII; HIDA, 2016).

Células originadas da medula óssea também estão envolvidas na angiogênese patológica, como células do sistema imunológico inato – macrófagos, neutrófilos, mastócitos e progenitores mieloides — que infiltram lesões pré-malignas e tumores avançados e instalam-se às margens de tais lesões. Essas células inflamatórias peri-tumorais auxiliam a ativar e sustentar a angiogênese associada com crescimento tumoral, contribuindo com o processo de invasão local (MURDOCH *et al.*, 2008; QIAN; POLLARD, 2010; ZUMSTEG; CHRISTOFORI, 2009).

Esses conhecimentos podem levar a oportunidades de desenvolver terapias que tenham seletividade específica para as células endoteliais associadas a tumores. A descoberta de um inibidor de angiogênese, em 1990, trouxe perspectivas para o tratamento de doenças dependentes de neovascularização. Atualmente pesquisas mostram que pacientes tratados com agentes quimioterápicos junto com a terapia antiangiogênica tiveram um aumento no tempo de vida (FOLKMAN, 2007).

Estimuladores de angiogênese, por sua vez, podem ser usados na terapia angiogênica, que visa a estimular o crescimento de vasos sanguíneos, a fim de restaurar ou aumentar a perfusão circulatória de tecidos, reverter isquemia periférica do miocárdio ou cerebral e acelerar a cicatrização de feridas, dentre outras opções terapêuticas (FERRARA; KERBEL, 2005).

1.2 Controvérsias nas terapias antiangiogênicas contra o câncer

A eficácia das terapias anticâncer representa a validação de uma marca do câncer particular: se essa marca é verdadeiramente importante para a biologia dos tumores, com efeito sua inibição deve prejudicar o crescimento e a progressão do câncer. A maioria dos medicamentos contra câncer foi direcionada para alvos moleculares específicos. Essa especificidade de ação resulta em menos toxicidade não específica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

VEGF-A, um regulador crucial tanto para angiogênese normal como patológica, revelou inovações terapêuticas em oncologia e oftalmologia. O primeiro inibidor de VEGF-A, bevacizumab, foi aprovado pelo *US Food and Drug Administration*, em 2004, para a primeira linha de tratamento de câncer colorretal metastático e os primeiros inibidores de VEGF-A em oftalmologia, pegaptanib e ranibizumab, foram aprovados em 2004 e 2006, respectivamente (FERRARA; ADAMIS, 2016).

Os inibidores de angiogênese podem ter efeito pela inibição da via de sinalização do VEGF, por meio de mecanismos diferentes. O primeiro mecanismo é a inibição direta da habilidade de ligação do VEGF ao seu receptor-alvo. Os anticorpos monoclonais, bevacizumab e ramucirumab, bem como o aflibercept receptor charmariz de VEGF, inibem angiogênese por meio desse mecanismo. E a segunda classe de inibidores de angiogênese são os agentes de moléculas pequenas, inibidores de tirosinoquinase, ativados por interação de ligação entre o VEGF e seu receptor. Estão

incluídos nessa classe: sunitinib, sorafenib, pazopanib, vandetanib, vatalanib, cabozantinib, axitinib, regorafenib e outros. Diferentemente dos anticorpos monoclonais, os agentes de moléculas pequenas podem alvejar outros receptores tirosinoquinase além da via do VEGF. Apesar dos avanços nas terapias antiangiogênicas, esses inibidores de angiogênese aumentam o risco de hipertensão, tromboembolismo arterial, isquemia e disfunção cardíaca (ABDEL-QADIR *et al.*, 2017).

Além disso, foram relatadas respostas inesperadas e resistência adquirida a drogas em terapias antiangiogênicas. Alguns previam que a inibição efetiva da angiogênese retardaria a progressão da doença (FOLKMAN; KALLURI, 2004).

As respostas clínicas para terapias antiangiogênicas, entretanto, foram consideradas transitórias (AZAM; MEHTA; HARRIS, 2010; BERGERS; HANAHAN, 2008; EBOS; LEE; KERBEL, 2009).

Além da resistência intrínseca às terapias antiangiogênicas, também podem ocorrer os mecanismos adaptativos de resistência evasiva para terapias antiangiogênicas (com alvo para vias de VEGF): ativação ou aumento da regulação de vias pró-angiogênicas alternativas, recrutamento de células pró-angiogênicas derivadas da medula óssea, aumento de cobertura por perícitos do tecido vascular tumoral (promove sobrevivência de células endoteliais) e ativação e aumento de invasão e metástase (BERGERS; HANAHAN, 2008).

Em certos modelos pré-clínicos, onde potentes inibidores conseguiram suprimir a angiogênese, os tumores adaptaram-se e houve aumento de invasão e metástase (AZAM; MEHTA; HARRIS, 2010; EBOS; LEE; KERBEL, 2009). Ao invadir os tecidos próximos as células tumorais ganham acesso ao tecido vascular normal e preexistente. Em glioblastomas humanos tratados com terapias antiangiogênicas houve aumento de invasão e metástase local (ELLIS; REARDON, 2009; NORDEN; DRAPPATZ; WEN, 2009; VERHOEFF *et al.*, 2009).

Também, em metástases pulmonares em humanos, foram observados distintos mecanismos de vascularização por vasos preexistentes, onde as células tumorais invadiram o espaço de ar do alvéolo ou as paredes alveolares, para ter acesso a capilares alveolares, e, em outros, as células cancerosas cresceram para cooptar por grandes vasos do pulmão. A coopção por vasos ocorreu em mais de 80% dos casos examinados (BRIDGEMAN *et al.*, 2017).

Em estudo com células de adenocarcinoma de pulmão, uma quimiocina induzida por hipóxia, quimiocina CC 28 (CCL28), promove angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Tumores formados por células de adenocarcinoma de pulmão com alta expressão de CCL28 cresceram mais rápido e mostraram maior densidade vascular, enquanto a taxa de formação de tumor de células de adenocarcinoma com expressão *knockdown* de CCL28 foi bastante baixa e com menor densidade vascular. O receptor de quimiocina CC3 (CCR3) que se liga à CCL28 foi altamente expresso em células endoteliais vasculares em adenocarcinoma de pulmão. Além disso, a via de sinalização CCL28/CCR3 pode ignorar ou contornar a via de VEGF/VEGFR (HUANG *et al.*, 2016).

Respostas inflamatórias e distribuição de drogas dependem de uma vascularização adequada. Tratamentos terapêuticos para o câncer, historicamente, visaram a inibir completamente o crescimento dos vasos, principalmente tendo como alvo a via de VEGF. Muitas contradições, entretanto, foram identificadas, já que o bloqueio do suprimento sanguíneo do tumor provoca hipóxia e complicações decorrentes, bem como dificulta a distribuição de drogas (JAIN, 2014). Terapia de normalização é uma alternativa para a redução de metástase em virtude da redução de hipóxia e melhoria na distribuição de drogas em tumores primários (CARMELIET; JAIN, 2011). A sinalização Notch é um alvo terapêutico para câncer e para normalização de vascularização (MURPHY *et al.*, 2012; RIDGWAY *et al.*, 2006; BENTLEY; CHAKRAVARTULA, 2017). Estudos sobre a regulação glicolítica de rearranjo celular em angiogênese confirmou que bloquear um ativador glicolítico (PFKFB3), que tem ação no brotamento de novos vasos sanguíneos, pode normalizar o rearranjo celular em angiogênese, em patologias que exibem elevados níveis de produção de VEGF (CRUYS *et al.*, 2016).

Assim, o tratamento seletivo e simultâneo de múltiplas marcas do câncer em combinação com mecanismos guiados, resultará em terapias mais efetivas contra o câncer em humanos (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.3 Como a própolis vermelha pode ajudar?

A própolis vermelha é produzida por abelhas *Apis mellifera L.* ou por espécies de abelhas sem ferrão. É constituída de resinas colhidas de ramos, brotos de folhas, cascas de árvores, flores e exsudados de várias plantas, além de secreções

e enzimas salivares, cuja mistura é depositada no interior das colmeias. E, ainda, a geoprópolis traz na composição de sua mistura principalmente argila e solo (CUNHA *et al.*, 2013; MARCUCCI, 2001; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SILVA *et al.*, 2008).

As abelhas usam a própolis para construir e reparar suas colmeias ou como barreira protetora contra invasores externos, isolante térmico, umidade e vento (WANG, 2013). Própolis foi usada em tempos antigos (~300 a.C.) em mumificações, medicina popular e, recentemente, é utilizada em indústria de comida e bebida, cosméticos, enxaguadura bucal e creme dental e outros (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; WANG, 2013). A própolis também é considerada alimento funcional, já que os constituintes biologicamente ativos em seu extrato propiciam benefícios à saúde (MEDIC-SARIC *et al.*, 2009; WANG, 2013). O maior interesse, todavia, está em pesquisar suas propriedades farmacológicas: antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, antiproliferativo, antiangiogênico e outros.

Os benefícios biológicos da própolis são bastante estudados em diversas áreas da Medicina como importante recurso na prevenção e tratamento de doenças orais e sistêmicas. O mercado global de produtos naturais é estimado em mais de 30 bilhões de dólares, e continua crescendo a cada ano. Com o avanço das pesquisas farmacológicas, a própolis poderá ser utilizada para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). Nos anos de 2010 a 2012 o preço do quilo de própolis bruta brasileira aumentou mais de 50% no mercado internacional. De acordo com dados de *Japan Trade Organization*, 92% da própolis bruta consumida no Japão vêm do Brasil (SCHMIDT *et al.*, 2014). Em particular, o preço da própolis vermelha é cinco vezes maior do que o de outros tipos de própolis (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

A cor e composição da própolis possui variações, sempre relacionadas com a vegetação de entorno da colmeia, podendo ser negra, amarela, marrom, verde ou vermelha (DAUGSCH *et al.*, 2008). Outros fatores também podem influenciar na composição da própolis, como o clima, a sazonalidade, altitude, o acesso das abelhas à vegetação. A principal classe de constituintes da própolis é a de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos de fontes vegetais são divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e derivados ácidos fenólicos. Essa diferença é importante quando se compara própolis de várias regiões. Na própolis europeia, o teor de flavonoides é mais expressivo, enquanto na própolis brasileira predominam os ácidos fenólicos (MARCUCI, 2006).

A própolis brasileira foi classificada em 12 grandes grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas (cor, textura, composição química) e a localização geográfica (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Somente em 2007, a própolis vermelha brasileira (PVB) foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira, e foi assim chamada em virtude de sua intensa coloração vermelha (ALENCAR *et al.*, 2007).

A própolis vermelha é produzida em várias regiões da Terra, como Brasil, Cuba (PICCINELLI *et al.*, 2011), Venezuela (TRUSHEVA *et al.*, 2004), México (LOTTI *et al.*, 2010), China (IZUTA *et al.*, 2009), porém a composição da própolis de cada local varia de acordo com a vegetação e com a espécie de abelha produtora. A diferença da composição química traz como resultados múltiplas atividades farmacológicas, principalmente, quando provenientes de regiões onde o clima é tropical (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000), e a vegetação tem maior riqueza e abundância em espécies, quando comparadas a outras onde o clima é temperado.

A origem botânica da própolis vermelha pode variar entre países, como resultado do clima e diversidade da flora específica de cada região. Dois métodos são normalmente usados para determinar a origem botânica da própolis: a comparação da composição química por uso de métodos cromatográficos (LÓPEZ *et al.*, 2014) e a análise palinológica (FREITAS *et al.*, 2011).

A origem botânica de própolis vermelha foi determinada por observação do comportamento de coleta das abelhas e pela comparação entre compostos fenólicos nos exsudados de plantas e na PVB por meio de cromatografia: *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taud. (Leguminosae) é a principal origem botânica e é responsável pela cor vermelha da própolis (PICCINELLI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2008; DAUGSCH *et al.*, 2008). Também foi utilizada a análise de códigos de barra de DNA (DNA *barcoding*) para identificação da origem botânica da PVB (JAIN *et al.*, 2014).

As espécies de *Dalbergia* são conhecidas por seu pigmento intensamente colorido, pela ocorrência de isoflavonas catiônicas C30 (retusapurpurinas A e B) (CZAKÓ; MÁRTON, 2001; PICCINELLI *et al.*, 2011). As abelhas *Apis mellífera* produzem a própolis com o exsudado vermelho que coletam de perfurações feitas por insetos nos caules e ramos de *D. ecastophyllum* (SILVA *et al.*, 2008). PVB pode ser encontrada em colmeias localizadas em manguezais e próximos do mar e de rios nos Estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Ceará e Roraima (PICCINELLI *et al.*, 2011; SILVA; LIBERATO, 2014; SILVA; LIBERATO; MARTINS,

2013). A PVB de Alagoas recebeu Indicação Geográfica (IG) do Instituto Nacional da Propriedade Industrial Brasileiro (INPI), certificando internacionalmente o Estado de Alagoas como o único produtor desse tipo de própolis em todo o mundo, em virtude das condições regionais do produto (SEBRAE, 2012).

O estudo da composição da própolis vermelha identificou mais de 300 compostos, dentre eles ácidos fenólicos e flavonoides, que são importantes antioxidantes. Um estudo que compara a própolis vermelha cubana com a própolis vermelha brasileira demonstrou que suas composições químicas são semelhantes entre si, e semelhantes ao exsudado de *Dalbergia ecastophyllum*: Isoliquiritigenin, liquiritigenin e naringenin, isoflavonas, isoflavans e pterocarpan; além disso, a presença de benzofenonas polipreniladas (PPBs) guttiferone E/xanthochymol e oblongifolin A é um diferencial na composição da própolis vermelha brasileira. Os isômeros guttiferone E e xantoquimol foram considerados uma mistura inseparável. Os autores sugerem que a PVB tenha outras origens botânicas em sua composição em virtude da ausência desses últimos três compostos citados no exsudado de *Dalbergia ecastophyllum* (PICCINELLI *et al.*, 2011). Esses três últimos compostos foram obtidos do extrato lipofílico (*n*-hexano) da PVB. Em razão da relevância no estudo desses compostos lipofílicos da PVB, foi estabelecido um método cromatográfico para determinar o conteúdo total de benzofenonas poli-preniladas (PPBs) na fração de *n*-hexano de PVB (HEXred) (FASOLO *et al.*, 2016).

A própolis vermelha, em tratamentos *in vivo* de carcinoma de células escamosas induzido por carcinogêno, mostrou efeito modulador na formação, crescimento, diferenciação e progressão tumoral (PINHEIRO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015).

Além disso, a própolis vermelha, em modelos animais, teve ação anti-inflamatória e antinociceptiva (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015), suprimiu inflamação durante reparo tecidual (CORRÊA *et al.*, 2017), reduziu hipertensão e dano renal (TELES *et al.*, 2015), aumentou o nível total de leucócitos, proteínas totais e globulina, e reduziu a concentração de triglicerídeos, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TPG) em ovelhas (MORSY *et al.*, 2013, 2016). Mostrou efeito protetor em modelo animal de colite ulcerativa (BARBOSA BEZERRA *et al.*, 2017).

Em estudo da toxicidade aguda e subaguda da própolis vermelha, em ratos, não foram observados efeitos letais para a dose de 300mg/kg, mas foram observados

sinais de toxicidade para essa dose. A maioria dos sinais para toxicidade subaguda foram observados em machos em uma dose de 200mg/kg. Além disso, os resultados desse estudo sugerem atividade estrogênica, possivelmente pela composição de isoflavonóides (da SILVA *et al.*, 2015). Óleo essencial de própolis vermelha apresentou, *in vitro*, efeito antiparasitário e, *in vivo*, atividade imunoestimuladora, com efeito sinérgico em administração combinada (SENA-LOPES *et al.*, 2018).

Em ensaios *in vitro*, a própolis vermelha teve efeito citotóxico em células tumorais de pâncreas humano (PANC-1) (AWALE *et al.*, 2008), linhagem de célula de câncer de mama (MCF-7) (KAMIYA *et al.*, 2012) e células tumorais (HeLa e Hep2) (FROZZA *et al.*, 2013), em linhagens de células tumorais (HL-60, K562, RPMI8226, B16F10) (NOVAK *et al.*, 2014), células tumorais humanas de glioblastoma (SF-295), ovário (OVCAR-8) e cólon (HCT-116) (de MENDONÇA *et al.*, 2015), células de carcinoma de bexiga humano (linhagem 5637) (BEGNINI *et al.*, 2014). Também foi estudado o efeito na expressão diferencial de proteínas em células tumorais Hep-2 *in vitro* após tratamento com própolis vermelha, havendo-se identificado regulação de proteínas envolvidas direta ou indiretamente nos mecanismos de sinalização de células cancerosas, ajudando a esclarecer os efeitos da própolis vermelha na regulação dos mecanismos envolvidos na inibição de proliferação de células do câncer (FROZZA *et al.*, 2014; DA SILVA FROZZA *et al.*, 2016).

A própolis vermelha, em testes *in vitro*, mostrou propriedade anti-inflamatória (BUENO-SILVA *et al.*, 2015), potencial para cicatrização (JACOB *et al.*, 2015) e atividade antibacteriana (ALMEIDA *et al.*, 2017; BISPO JR *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2010; INUI *et al.*, 2014; REGUEIRA NETO *et al.*, 2017; RIGUI *et al.*, 2011). Além disso, nanopartículas de própolis vermelha e o próprio extrato de própolis vermelha mostraram atividade citotóxica *in vitro* para *Leishmania (V.) braziliensis* (do NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Ainda, em testes *in vitro*, a própolis vermelha induz diferenciação de pré-adipócitos (3T3-L1) em adipócitos, por aumentar a atividade transcricional de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma-gama (PPAR γ) (controla a expressão de genes envolvidos na diferenciação de adipócitos e regula o metabolismo de lipídeos), além de reduzir os efeitos inibitórios do fator de necrose tumoral (TNF) - α na diferenciação de adipócitos e na produção de adiponectina (IIO *et al.*, 2010). Adiponectina é importante por ter propriedades anti-hiperglicêmica, antiterogênica e anti-inflamatória, e, normalmente, a obesidade está relacionada com baixos níveis de

adiponectina (NIGRO *et al.*, 2014). A própolis vermelha também aumentou expressão de transportador A1 com cassete de ligação ao ATP (ABCA-1), que promove o efluxo de colesterol em macrófagos, um processo importante na aterosclerose (IIO *et al.*, 2012).

Outros estudos isolaram compostos da própolis vermelha e investigaram os efeitos de compostos Formononetina, Biochanina A, Mucronulatol, 3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpan, Xantoquimol, dentre outros, e alguns deles mostraram atividade antiproliferativa (FREIRES *et al.*, 2016). Em estudo *in vitro* que investigou o efeito citotóxico de 42 compostos isolados da própolis vermelha, contra linhagens de células tumorais humanas (A549, HeLa, HT-1080), e murinas (26-L5, B16-BL6, LLC), resultou que o composto com efeito citotóxico mais expressivo para todas as linhagens foi o (2S)-7-hidroxi-6-metoxiflavanone, comparado com o controle positivo de tratamento com 5-fluorouracil e doxorubicin; outros compostos isolados também mostraram atividade citotóxica contra algumas das linhagem celulares testadas (LI *et al.*, 2008).

Uma fração de própolis vermelha contendo chantoquimol e formononetin teve efeito antiproliferativo *in vivo*, em melanoma murino (B16F0), e *in vitro*, em linhagens de células tumorais (HL-60, K562, RPMI8226, B16F10) (NOVAK *et al.*, 2014). Outras frações de própolis vermelha, contendo formononetin e/ou liquiritigenin exibiram atividade citotóxica, *in vitro*, em células tumorais Hep-2, mais expressiva do que o próprio extrato de própolis vermelha (FROZZA *et al.*, 2017). Formononetin também teve atividade anti-inflamatória em camundongos (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015).

Estudos com neovestiol, vestiol e isoliquiritigenin, compostos isolados da própolis vermelha, exibiram atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (BUENO-SILVA *et al.*, 2013), atenuaram sinais da inflamação em macrófagos ativado por lipopolissacarídeo (BUENO-SILVA *et al.*, 2015). O vestiol também modulou migração de neutrófilos no processo inflamatório (FRANCHIN *et al.*, 2016). Fração *n*-hexano de benzofenona obtida de própolis vermelha mostrou efeito antifúngico *in vitro* contra *Candida sp.* (PIPPI *et al.*, 2015).

Outros tipos de própolis, a própolis verde, inibiu angiogênese em carcinoma de bexiga induzido por *N*-butil-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN) em ratos (DORNELAS *et al.*, 2012a). A própolis vermelha portuguesa também teve efeito antiangiogênico *in vitro* e *in vivo* (SILVA-CARVALHO *et al.*, 2014, 2015). O extrato de polifenóis de própolis vermelha também exibiu atividade antiangiogênica *in vivo*, com

resultados mais expressivos do que os extratos de polifenóis de própolis verde e marrom testados (DALEPRANE *et al.*, 2012). O efeito da própolis vermelha sobre a angiogênese, todavia, não está bem estudado. A observação de que a própolis vermelha inibe a angiogênese poderá trazer novas perspectivas para o tratamento de angiogênese tumoral, doenças autoimunes, retinopatia diabética, psoríase, entre outras doenças.

1.4 A L-lisina, um aminoácido essencial na alimentação e nas pesquisas

A confirmação de que a L-lisina pode estimular a angiogênese seria de grande valor terapêutico, no tratamento de doenças dependentes da neovascularização, como úlceras pépticas e isquemia do miocárdio. Além disso, há poucos estudos sobre sua ação na proteção de genotoxicidade e na promoção da carcinogênese. Em estudo da densidade microvascular de tumores de ratos que receberam carcinógeno BBN e L-lisina (40 semanas desde o início da administração do carcinógeno), a L-lisina estimulou a angiogênese (DORNELAS *et al.*, 2012a). A L-lisina também promoveu a carcinogênese induzida pelo BBN, com tumores mais invasivos e maior multiplicidade de tumores (DORNELAS *et al.*, 2012b). Além disso, a L-lisina protegeu contra genotoxicidade quando administrada concomitantemente com o BBN e reverteu o efeito genotóxico do BBN quando administrada semanas após o carcinógeno (DORNELAS *et al.*, 2014). Pacientes portadores de câncer precisam ser orientados a diminuir a ingestão de L-lisina na alimentação, bem como alimentos ricos em L-lisina, como trigo e o milho, carnes, caso isso seja confirmado.

L-lisina é um aminoácido essencial, que o organismo humano não pode produzir, e que pode ser obtido por suplementação e na dieta. Esse aminoácido foi isolado da caseína, uma proteína do leite, pela primeira vez, em 1889. A produção industrial da L-lisina é feita por bactérias ou fungos, ou ainda por meio químico, sendo predominante a utilização de *Corynebacterium glutamicum*, que sintetiza a L-lisina por fermentação de carboidratos ou açúcares em biorreatores. Esse aminoácido, juntamente com outros, é utilizado como aditivo em rações e suplementos alimentares (EGGELING; BOTT, 2015). Além disso, é aplicado em formulações farmacêuticas e em cosméticos (KOFFAS; STEPHANOPOULOS, 2005).

L-lisina é importante para o crescimento adequado, desempenha papel fundamental na produção de carnitina, aminoácido responsável pela conversão de

ácido graxo em energia, e ajuda a baixar o colesterol (SINGH *et al.*, 2011). A *L*-lisina é necessária para a síntese de colágeno, o crescimento e reparo tecidual e a produção de anticorpos, hormônios e enzimas. No homem, é absorvida no intestino delgado, nos enterócitos, por transporte ativo, e se dirige ao fígado, via sistema porta. Uma vez no fígado, junta-se a outros aminoácidos na síntese de proteínas. A *L*-lisina é convertida em acetil-CoA, componente do metabolismo de carboidratos na produção de energia (*L-LYSINE*, 2007).

Esse aminoácido é bastante utilizado por atletas para melhorar o ganho de massa magra. Além disso, *L*-lisina melhora a absorção de Ca^{++} e diminuição da excreção de cálcio pelos rins, sendo sugerida sua utilização para prevenir e auxiliar no tratamento de osteoporose (SINGH *et al.*, 2011).

Lisina, o primeiro aminoácido limitador típico da dieta suína, é substrato para a produção de proteínas, peptídeos e moléculas de não-peptídeo no corpo, sendo o excesso de lisina catabolizado como fonte de energia. *L*-lisina está no nível mais alto do controle de metabolismo de aminoácidos, e lisina pode também afetar o metabolismo de outros nutrientes. O efeito de lisina na produção e atividade de hormônio é refletida pela mudança de concentração de insulina no plasma e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) -1 (LIAO; WANG; REGMI, 2015).

Além disso, sabe-se que resíduos de lisina em peptídeos são importantes sítios para modificações pós-translacionais em proteínas envolvidas na regulação epigenética de expressão de genes. Em recém-nascidos humanos, o erro de um transporte de aminoácidos catiônico pode levar à intolerância a proteína lisinúrica. Em animais, foi verificado que a deficiência de lisina na dieta pode prejudicar a imunidade e deixar o animal mais suscetível a infecções (LIAO; WANG; REGMI, 2015).

Em estudo com pacientes coronariopatas graves que ingeriram altas doses de *L*-lisina por tempo prolongado, houve melhora de sintomas de angina peitoral. Nesse estudo, os autores sucitaram a hipótese de que o aminoácido pode se ligar e remover lipoproteínas da placa aterosclerótica, reduzindo o espessamento da parede e melhorando o fluxo vascular ou, ainda, produzindo vasodilatação (McBEATH; PAULING, 1993; PAULING, 1993). Em modelo animal, uma dieta com suplemento de *L*-lisina reduziu a calcificação cardiovascular induzida (SHIMOMURA *et al.*, 2014).

O tratamento de pacientes com insuficiência venosa cerebral crônica com aescinato de *L*-lisina ofereceu melhora na hemodinâmica cerebral (aumento da reserva hemodinâmica e normalização da velocidade linear do fluxo sanguíneo nas

veias profundas) (CHUKANOVA; MAMAEVA; CHUKANOVA, 2016). Aescinato de *L*-lisina melhorou o fluxo intracraniano e o funcionamento da microcirculação, sem afetar o tipo normal de microcirculação, ou alterando-a para melhorar os parâmetros hemodinâmicos, sendo recomendado pelos autores no tratamento de pacientes jovens e de meia-idade com distúrbio de circulação sanguínea venosa cerebral com predominância de vagotomia bem como hipersimpaticotonia (D'YAKONOVA *et al.*, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* com pacientes diabéticos mostrou que a suplementação com *L*-lisina, como um inibidor de glicação não enzimática do fibrinogênio, melhorou *in vitro* e *in vivo* a estrutura e função do fibrinogênio, cujo mau funcionamento está relacionado a complicações da diabetes (MIRMIRANPOUR *et al.*, 2012). Além disso *L*-lisina previne o risco de infecção em pacientes com diabetes melito tipo 2 (MIRMIRANPOUR *et al.*, 2016). Terapia com *L*-lisina também previne, na diabetes, o aumento de glicose e os produtos finais da glicação avançada (AGEs), hemoglobina A_{1c} (Hb A_{1c}), triglicerídeos, colesterol total e LDL; e isso causa um aumento na capacidade antioxidante, em HDL-c, na funcionalidade do HDL e proteína de choque térmico (HSP70). *L*-lisina não tem efeito nos níveis de insulina. A conformação da albumina sérica (Alb) muda em decorrência da glicação e *L*-lisina é capaz de manter Alb semelhante à normal (JAFARNEJAD *et al.*, 2008). *L*-lisina pode interagir com outros nutrientes e alterar o metabolismo de alguns aminoácidos, porém não afetou os níveis de ferro e cobre (BERTINATO *et al.*, 2016).

Foram testados os efeitos de uma dieta com suplemento de *L*-Lisina na degradação de proteína miofibrilar e em sistemas proteolíticos em camundongos com senescência acelerada (SAMP8). Os resultados indicaram que a dieta com suplementação de *L*-lisina reduziu sarcopenia por suprimir a degradação e autofagia da proteína miofibrilar em musculo esquelético (SATO; ITO; NAGASAWA, 2017).

Um estudo pré-clínico avaliou o efeito da *L*-lisina na Terapia Alfa Visada (*Targeted alpha therapy* - TAT) com ²¹³Bismuto-DOTA-TRY³-octroyotata (213Bi-DOTATATE) para receptores de somastatina expressos em tumores neuroendócrinos em camundongos. As doses de TAT em tratamentos são limitadas pela ocorrência de nefrotoxicidade causada pela retenção de radiopeptídeos no túbulo proximal, porém, nesse estudo, *L*-lisina reduziu a absorção renal de 213Bi-DOTATATE, sem afetar a

absorção tumoral do radiopeptídeo, dando evidências de que houve bloqueio farmacológico do néfron com redução da nefrotoxicidade (CHAN *et al.*, 2016).

Em ensaio *in vitro*, várias linhagens de sarcomas humanos (osteossarcoma MNNG-HOS, osteossarcoma U-2OS e rabdomiossarcoma RD) foram tratadas com uma mistura de nutrientes contendo *L*-lisina – vitamina C (ácido ascórbico e Mg, Ca e ascorbato de palmitato) 700 mg, *L*-lisina 1000 mg, *L*-prolina 750 mg, *L*-arginina 500 mg, *N*-acetil cisteína 200 mg, extrato de chá verde (80% polifenol) 1000 mg, Se 30 µg, Cu 2 mg, Mn 1 mg – em variadas doses. O estudo evidenciou que essa mistura de nutrientes inibiu o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) e aumentou a regulação da atividade de inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) em todas as linhagens de células de câncer, dependendo da dose, além de mostrar uma correlação positiva entre u-PA e MMPs e uma correlação negativa entre u-PA/MMPs e TIMPs (ROOMI *et al.*, 2013). Outras linhagens de células humanas também foram tratadas em cultura com a mesma mistura de nutrientes, resultando em inibição de monômeros e dímeros de MMP-9 em todas as linhagens testadas (ROOMI *et al.*, 2016). Uma mistura de nutrientes contendo *L*-lisina também suprimiu incidência, crescimento e metástase para o pulmão de células de câncer ovariano humano em ensaios *in vitro* e *in vivo* (ROOMI *et al.*, 2017).

1.5 Carcinossarcoma de Walker: modelo para o estudo da angiogênese

Diversas pesquisas são desenvolvidas para estudar os múltiplos fatores associados ao câncer. Pesquisas pré-clínicas *in vitro* e *in vivo* buscam em distintos modelos encontrar respostas para essa doença. Este experimento utilizou células tumorais de carcinossarcoma de Walker como modelo para estudo da angiogênese tumoral.

O carcinossarcoma de Walker era um carcinoma quando foi encontrado em glândula mamária de rata albina prenhe. Após a morte do animal, o carcinoma foi retirado e mantido por sucessivas inoculações em ratos pelo Dr. Walker em 1928 (EARLE, 1955). No Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LNOE) da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram criados diversos modelos com o tumor de Walker em diversos órgãos, entre eles: pulmão (GOMES-NETO *et al.*, 2002), estômago (OLIVEIRA *et al.*, 1998), rim (SILVA *et al.*, 2002), cavidade oral (ALVES *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2007), fígado (ZARUR

et al., 2004) e bexiga (DORNELAS *et al.*, 2006). O carcinossarcoma de Walker atualmente é mantido por múltiplas passagens em ratos.

Foi estabelecido modelo de metástase hepática com administração de VEGF em ratos com tumor de Walker (LIU *et al.*, 2015). Em estudo com ratos Brattleboro deficientes em laminina foram observadas mudanças no padrão de laminina (KHEGAY; IVANOVA, 2015). Também foi desenvolvido um modelo farmacocinético/ farmacodinâmico populacional, ligando as concentrações de etoposídeo livre tumoral e plasmática à inibição do crescimento de tumores sólidos em ratos (PIGATTO *et al.*, 2017).

Estudou-se a osteólise tumoral induzida por inóculo, *in situ*, de células de tumor de Walker/ células malignas B, para avaliar a angioarquitetura do fêmur e os efeitos hematológicos dessas células tumorais (BADRAOUI *et al.*, 2014b). Também foi estudado a mudanças séricas de metaloproteinases durante o desenvolvimento do fenótipo de resistência do carcinossarcoma de Walker (CHEKHUN *et al.*, 2015). Com esse modelo de ratos com tumor de Walker, foi investigado o mecanismo de lesão oxidativa no cerebelo no curso de tempo em modelo de caquexia por câncer, observando principalmente o aumento dos níveis de NO (óxido nítrico) no cerebelo (FENNER *et al.*, 2015).

Inóculos de células de carcinossarcoma de Walker implantados em animais foram utilizados para avaliação de efeitos, mecanismos de ação e toxicidade de substâncias diversas e para outros procedimentos (Quadro 1).

No presente estudo foi desenvolvido modelo com inóculo de carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster para estudar os efeitos da própolis vermelha e L-lisina no tumor e na angiogênese tumoral.

Quadro 1 – Estudos com ratos inoculados com carcinossarcoma de Walker.

Tratamento	Objetivo	Autor(es)
Óleo de peixe	Efeito antitumoral, COX-2, PPAR- γ , gene RelA, expressão de proteínas.	Borghetti (<i>et al.</i> , 2013, 2015)
Óleo de copaíba	Efeito antitumoral.	Botelho (<i>et al.</i> , 2013)
Metamorfina	Efeito antitumoral na síndrome metabólica.	Franco (<i>et al.</i> , 2014)
Vitamina E	Atividade de reabsorção de osteoclastos e citomorfometria em ratos osteolíticos.	Badraoui (<i>et al.</i> , 2014a)
Leucina	Metabolismo de proteínas em musculo gastrocnêmio fetal de ratas prenhas.	Cruz e Gomes-Marcondes (2014)
Hipertermia	Metabolismo de lipídios durante o crescimento tumoral.	Efremov (<i>et al.</i> , 2014)
Hipertermia	Efeito antitumoral.	Wang (<i>et al.</i> , 2014)
Doxorubicin	Metabolismo energético, K ⁺ e Mg ⁺⁺ na resistência ao quimioterápico.	Todor (<i>et al.</i> , 2015)
Metformin	Mecanismo do crescimento tumoral e efeito antitumoral na obesidade.	Queiroz (<i>et al.</i> , 2015)
Celecoxibe e ibuprofeno	Gluconeogênese no fígado.	De Souza (<i>et al.</i> , 2015a)
Celecoxibe e ibuprofeno	Desordem metabólica.	De Souza (<i>et al.</i> , 2015b)
Lactonas sesquiterpênicas de <i>M. polymorphum</i>	Efeito antitumoral.	Martins (<i>et al.</i> , 2015)
PEA e MEUS	Efeito antitumoral.	Gao (<i>et al.</i> , 2015)
Creatina	Efeito antitumoral, metabolismo da homocisteína, estres oxidativo e caquexia.	Deminice (<i>et al.</i> , 2016a)
Exercícios de resistência	Metabolismo da homocisteína e o balanço redox.	Deminice (<i>et al.</i> , 2016b)
Canabinóide tipo 2 receptor agonista AM1241	Tolerância a morfina.	Zhang (<i>et al.</i> , 2016)
Crotoxin	Ação antitumoral.	Brigatte (<i>et al.</i> , 2016)
Ginsenoside Rg 3 e Rh 2	Perfil farmacocinético.	Fan (<i>et al.</i> , 2016)
L-glutamina 2%	Caquexia e efeito protetor de células intersticiais de Cajal.	Fracaro (<i>et al.</i> , 2016)
Vinho tinto cabernet franc	Efeito antitumoral.	Stipp (<i>et al.</i> , 2017)
Pioglitazone/ Pioglitazone associado a insulina	Resistência à insulina, caquexia e anormalidades metabólicas.	de Fatima-Silva (<i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Próprio autor.

Legenda: PEA (ablação percutânea de etanol); MEUS (Microbubble-enhanced ultrasound).

1.6 Modelo de bolsa jugal de hamster (*Mesocricetus auratus*)

Para avaliação da angiogênese, foi utilizado um modelo de bolsa jugal de hamster (*Mesocricetus auratus*). A espécie *Mesocricetus auratus* é também conhecida como hamster sírio dourado, por causa de região de origem no norte da Síria. O hamster sírio dourado foi descrito em 1839. Esse animal experimental tem um local imunologicamente privilegiado no subepitélio da bolsa jugal, que existe nos dois lados da cavidade oral (HOCHMAN *et al.*, 2003). Esse local se caracteriza pela deficiência ou ausência de uma via anatômica aferente que drena material antigênico para uma estação linfática regional, onde ocorre o reconhecimento do antígeno e inicia uma resposta imune (HEAD; BILLINGHAM, 1985).

A bolsa jugal ou bolsa gutural de hamsters são divertículos altamente distensíveis, invaginações bilaterais da mucosa jugal. Elas se estendem, sob a pele, desde a da borda posterior da cavidade oral até as escápulas do animal. A função principal dessas bolsas é o armazenamento e transporte de alimento. As fêmeas podem usar para transportar os filhotes. A bolsa jugal se esvazia por contração do músculo retrator. Cada bolsa é formada por estratos de células epiteliais, sustentados em tecido conjuntivo areolar, sem vasos linfáticos (BARKER; BILLINGHAM, 1971), exceto entre as fibras do músculo retrator da bolsa (GOLDENBERG, 1970; GOLDENBERG; STINBORN, 1970). Estações linfáticas de drenagem regional de cada bolsa seria, teoricamente, o linfonodo da região cervical de superfície (ARRUDA; MONTENEGRO, 1995; SINHORINI; MERUSSE; MARIANO, 1994).

A bolsa jugal contém camada basal espinhosa, granular e córnea com queratinócitos, semelhante à epiderme e ao epitélio das gengivas ou palato duro dos seres humanos (HOCHMAN *et al.*, 2003). Além da ausência de estruturas anexas, a bolsa jugal não tem pigmentação. O fornecimento vascular da bolsa jugal de hamster é realizado por artérias superiores, médias e inferiores, que são ramos da artéria labial inferior. Todo esse complexo vascular está ligado por uma grande quantidade de anastomoses arterial e venosa, que ligam, sob a mandíbula, ambas as bolsas. Assim, este modelo de fornecimento de sangue traz um subsídio anatômico que assegura, do ponto de vista vascular, a integração e o crescimento de tecidos enxertados em qualquer parte da bolsa (HOCHMAN *et al.*, 2005).

O subepitélio da bolsa jugal de hamster foi utilizado para estudos de enxertos de doenças cutâneas benignas, como nevo, verrugas, queratose seborreica,

hiperplasia de sebo, xantomias, angiomas, dermatofibromas e neoplasias malignas, como carcinoma basocelular e espinocelular (SMITH, 1969; WOLF; HUBLER, 1975) e melanoma cutâneo (DUFOUR *et al.*, 1980). O modelo de bolsa jugal de hamster também foi utilizado para estudos de carcinogênese (AHN *et al.*, 2011; MONTI-HUGHES *et al.*, 2015; SILVAN; MANOHARAN, 2013), testes de ação de drogas quimioterápicas (DUFOUR *et al.*, 1980; LOW *et al.*, 2016; de SOUZA *et al.*, 2014), bem como para a identificação de substâncias carcinogênicas (ZIEGLER; LOPEZ; BARKER, 1975; ZIEGLER; BARKER, 1978), diagnóstico de câncer oral (AHN *et al.*, 2011; PANDE *et al.*, 2016), sendo o modelo de carcinogênese química mais aceito para estudo de câncer oral (CHEN *et al.*, 2012; MONTI-HUGHES *et al.*, 2015). Em razão da transparência do epitélio e da sua rica vascularização, a bolsa jugal de hamster pode ser usada como modelo para estudos da angiogênese (AROMANDO *et al.*, 2014; WOLF; HUBLER, 1975; LINGEN *et al.*, 1997), estudos bioquímicos para reações inflamatórias e alérgicas (RAUD *et al.*, 1989), bem como para avaliação *in vivo* da microcirculação (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; FOX; FRAME, 2002; SILVA *et al.*, 2011; SVENSJÖ *et al.*, 2003). Pode também ser usada em pesquisas com doenças cutâneas infecciosas e parasitárias (ARRUDA; MONTENEGRO, 1995; da SILVA *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da própolis vermelha e da *L*-lisina na angiogênese tumoral e na progressão tumoral do carcinossarcoma de Walker inoculado em bolsa jugal de hamster.

2.2 Objetivos Específicos

Criar modelo de inóculo de células de carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster.

Elaborar método de exposição da bolsa jugal, para captação de imagens digitais, quantificação mesoscópica, em plano único, em imagens digitais, da angiogênese e da área e perímetro tumoral.

Avaliar o efeito da própolis vermelha e da *L*-lisina na angiogênese tumoral de carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster.

Avaliar o efeito da própolis vermelha e da *L*-lisina no crescimento tumoral (área e perímetro tumoral) do carcinossarcoma de Walker.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental e cuidados animais

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC – Protocolo nº 89/2015. Foram utilizados 57 hamsters *Mesocricetus auratus*, com 120 dias de vida, fornecidos pelo biotério do Departamento de Cirurgia da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em temperatura de 25°C, em ciclo de luz claro-escuro de 12 horas e com acesso a água e alimento *ad libitum*. Durante todo o experimento, os animais foram pesados semanalmente e avaliados clinicamente. Foram observadas possíveis mudanças espontâneas no comportamento, contrações involuntárias, respiração, diarreia, anorexia, perda de peso, queda de pelos, pelos eriçados, movimentação atípica. Os animais foram distribuídos em oito grupos, contendo cada grupo, no máximo, sete animais por caixa. O delineamento deste estudo é experimental-controlado.

Foi estabelecido um critério de exclusão: animais que, por acidente de inóculo, tiveram invasão tumoral ou não crescimento do tumor. Foram incluídos no estudo 51 animais.

Os grupos de I, II, III e IV receberam as substâncias por gavagem, durante dez dias após o inóculo das células tumorais na bolsa jugal, sendo iniciada a administração das substâncias no dia 1 (um dia após o inóculo) e finalizada no dia 10 (Figura 2).

Grupo I (6 animais): recebeu própolis vermelha 200 mg/5ml/kg peso.

Grupo II (6 animais): recebeu *L*-lisina 150mg/ kg peso.

Grupo III (controle, 6 animais): recebeu goma arábica a 1% 5ml/ kg peso.

Grupo IV (controle, 6 animais): recebeu água destilada 5 ml/kg peso.

Os animais dos grupos de V, VI, VII, VIII receberam gavagem das substâncias-teste durante 33 dias antes da bolsa jugal receber o inóculo das células tumorais e dez dias após o inóculo, do dia 1 (um dia após o inóculo) ao dia 10 (Figura 2).

Grupo V (7 animais): recebeu própolis vermelha 200 mg/5ml/kg peso.

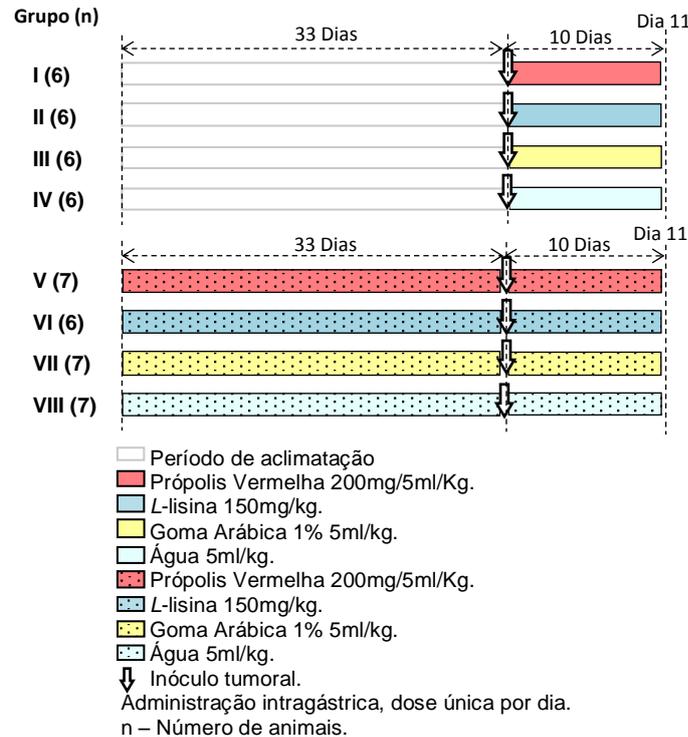
Grupo VI (6 animais): recebeu *L*-lisina 150 mg/kg peso.

Grupo VII (controle, 7 animais): recebeu goma arábica a 1% 5ml /kg peso.

Grupo VIII (controle, 7 animais): recebeu água destilada 5 ml/kg peso.

Todos os animais foram mortos, por dose aprofundada de anestésico, no 11º dia do experimento, após a ressecção da bolsa jugal.

Figura 2 – Desenho experimental.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Dia 11 – último dia de experimento. 33 Dias – tratamento por 33 dias antes do inóculo tumoral. 10 Dias – tratamento por dez dias após o inóculo tumoral.

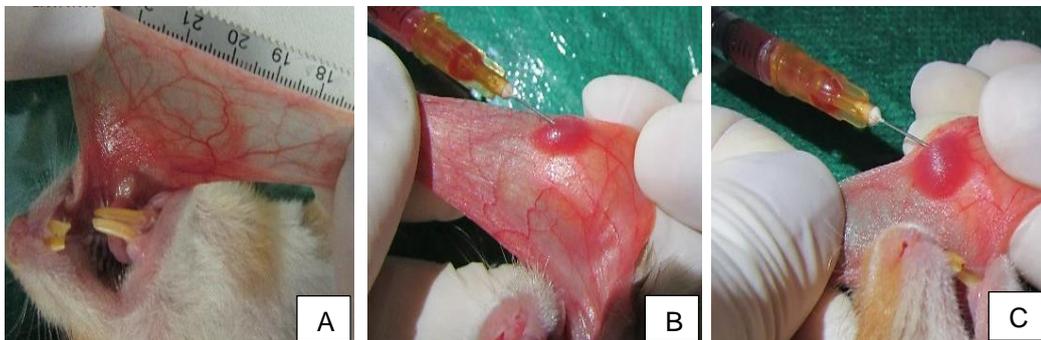
3.2 Células tumorais de Walker 256 e inóculo em bolsa jugal de hamster

As células tumorais usadas foram de carcinossarcoma de Walker 256, fornecidas pelo LNOE. Este tumor é mantido há mais de 20 anos por inoculação intramuscular de suspensão de células tumorais, em face medial de coxa de rato, com repicagem a cada sete dias. No 7º dia após inóculo das células do tumor de Walker em rato, estes foram mortos com dose aprofundada de anestésico (3x quetamina e xilazina) para retirada do tumor. O tecido tumoral ressecado foi triturado com tesoura cirúrgica em uma solução de ringer lactato 5ml e gentamicina 0,1ml, sob o gelo. Em seguida, as células tumorais viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com

azul de tripan 4%. Finalmente, foi preparada uma suspensão a com concentração de $1,2 \times 10^7$ células/ml.

Para estabelecer a técnica e a quantidade de células tumorais, foi feito previamente um estudo-piloto (Apêndice A). Para o inóculo das células tumorais cada animal foi anestesiado por injeção intraperitoneal com mistura de quetamina (100 mg/kg peso) e xilazina (10 mg/kg peso). Em seguida, a bolsa jugal esquerda foi evertida e limpa com soro fisiológico, e, então, foi realizada a inoculação da suspensão de células, subepitelial, no retículo central, com seringa de insulina e agulha hipodérmica, de aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células de carcinossarcoma de Walker em 0,1 ml de solução. O inóculo foi feito em área distante das fibras do músculo retrator da bolsa que se inserem no seu terço proximal, com o intuito de evitar o contato com vasos linfáticos (Figura 3 - A, B e C).

Figura 3 – A – Bolsa jugal de hamster evertida e limpa. B – Inóculo de suspensão de células tumorais de Walker na bolsa jugal. C – Inóculo finalizado medindo menos de 1,0 cm.



Fonte: Próprio autor.

3.3 Preparo e administração de *L*-lisina e extrato de própolis vermelha

O aminoácido *L*-lisina monoclóridrato ($C_6H_{14}N_2O_2.HCl$; CAS: 657-27-2, FAGRON), de origem e procedência da China, foi administrado por gavagem em solução aquosa na dose de 150 mg/kg de peso do animal (DORNELAS, 2009). A dose diária, calculada de acordo com a variação de peso semanal, foi diluída em água destilada no momento na administração.

A própolis *in natura* foi adquirida de fornecedor idôneo da cidade de Barra de Santo Antônio – Alagoas, durante o mês de junho. A extração etanólica foi realizada

no Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais (LBPN) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. O extrato etanólico de própolis vermelha foi obtido por extração a frio em etanol 95%. Após evaporação quase completa do etanol, o extrato etanólico 'mãe' foi estocado a 4°C (Figuras 4 - A, B, C, D, E, F e G).

Figura 4 – A – Própolis vermelha *in natura*. B – Própolis vermelha triturada. C – Extrato etanólico de própolis vermelha. D – Extrato de própolis evaporando o álcool em rota-evaporador. E – Extrato de própolis concentrado após passar pelo rota-evaporador. F – Extrato de própolis após banho-maria. G - Extrato aquoso de própolis vermelha.



Fonte: Próprio autor.

O extrato de própolis em goma arábica 1% foi administrado diariamente por gavagem na dose de 200 mg/ 5ml/ kg peso (200mg de própolis para 5 ml de goma arábica a 1% por kg de peso do animal) (BHADAURIA; NIRALA; SHUKLA, 2008; SHULKA; BHADAURIA; JADON, 2004). A extração em solução aquosa de goma arábica a 1%, foi feita, semanalmente, a quente (com temperatura até 60°C), sob agitação.

A solução de goma arábica 1% na dose de 5,0 ml/kg de peso foi preparada semanalmente, conforme variação do peso dos animais.

3.4 Captura de imagem para quantificação da angiogênese e do tamanho tumoral

O implante tumoral foi fotografado no 11º dia após o inóculo das células tumorais. Nesse procedimento, com o animal anestesiado (xilazina 10 mg/kg + quetamina 100 mg/kg), a bolsa jugal foi evertida, limpa com soro fisiológico (Figura 5 - B). A bolsa jugal foi ressecada em sua base, utilizando-se bisturi elétrico (corte e cauterio), evitando esvaziamento dos vasos sanguíneos que alimentavam o tumor (Figura 5 - C). Após esse procedimento foi feita a eutanásia com dose letal de anestésico, aprofundando a anestesia.

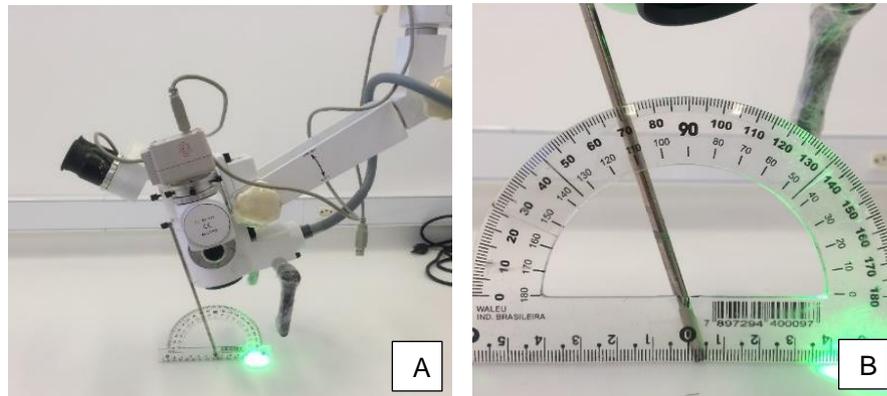
Uma vez procedida à ressecção, o tecido da bolsa jugal foi fixado em uma placa de Petri contendo um fundo branco emborrachado (Figura 5 - D e E). Em seguida, o tecido foi posicionado para visualização ao microscópio cirúrgico (D.F. Vascellos M90, D.F. Vasconcellos S.A., São Paulo – SP) (Figura 5 - F), com o eixo da objetiva fixo em um ângulo de 70° com o plano horizontal (Figura 6 – A e B). Foram obtidas fotomicrografias panorâmicas do inóculo tumoral com o aumento de 10x e fotomicrografias dos quadrantes superiores direito e esquerdo e inferiores direito e esquerdo com o aumento de 16x. As fotomicrografias foram obtidas por câmera de vídeo analógica (Hitachi VCC-151, Japan) acoplada ao microscópio. Para o armazenamento das imagens digitais, foi utilizado notebook com sistema de captura de vídeo (PixelView® PV-TV340P, ProLink Microsystem Corp., Taiwan) (Figura 5 - A).

Figura 5 – A – Estrutura para o procedimento de ressecção e fotografia do tumor. B – Bolsa jugal com tumor de Walker. C – Cauterização de vasos e ressecção da bolsa jugal com bisturi elétrico. D – Abertura lateral da bolsa jugal para montagem. E – Montagem a fresco do tecido em plano branco. F – Observação do tumor com microscópio estereoscópico.



Fonte: Próprio autor

Figura 6 – A – Angulação da objetiva do microscópio cirúrgico.
B – Ângulo de 70° com o plano horizontal.



Fonte: Próprio autor.
Microscópio cirúrgico D.F. Vascellos M90, D.F. Vasconcellos S.A., São Paulo – SP.

Após a análise ao microscópio, as bolsas jugais foram fixas em placas de acetato. Em seguida, os tecidos foram submetidos à fixação em formalina tamponada 10%. Após 48 horas de fixação os tecidos foram clivados, processados e incluídos em parafina.

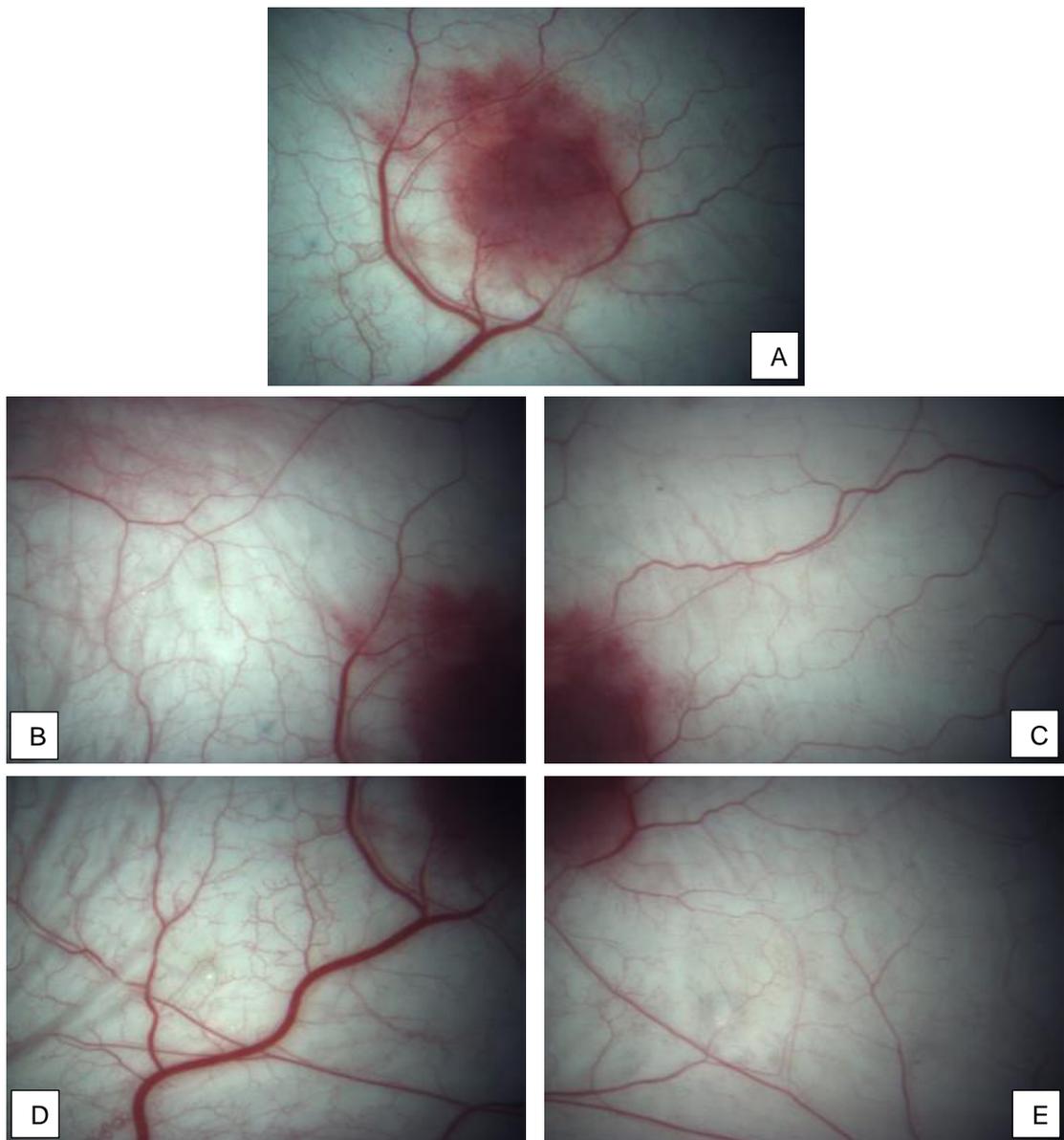
3.5 Área de vascularização

A angiogênese tumoral do implante (Figura 7 - A) foi quantificada utilizando-se um sistema que quantifica a resposta neovascular em imagens digitais, da peça montada a fresco, dos quadrantes superiores direito e esquerdo e inferiores direito e esquerdo (aumento 16x) (Figura 7 - B, C, D, E).

As imagens digitais de tamanho 1024 x 768 px foram reduzidas para 340 x 255 px com o *software* IrfanView e salvas no formato bmp, tamanho e formato necessários para operação do SQAN. Em seguida, as imagens de cada quadrante foram processadas com o *software* SQAN (Sistema de Quantificação de Angiogênese). O sistema do programa é composto por cinco módulos principais: seleção da região interessada (na imagem original), pré-processamento, segmentação, pós-processamento, quantificação da angiogênese (FECHINE-JAMACARU, 2006). Com esse *software*, foi determinada área de vascularização como um parâmetro de quantificação da angiogênese (Figura 8 – A, B, C, D). Obteve-se a

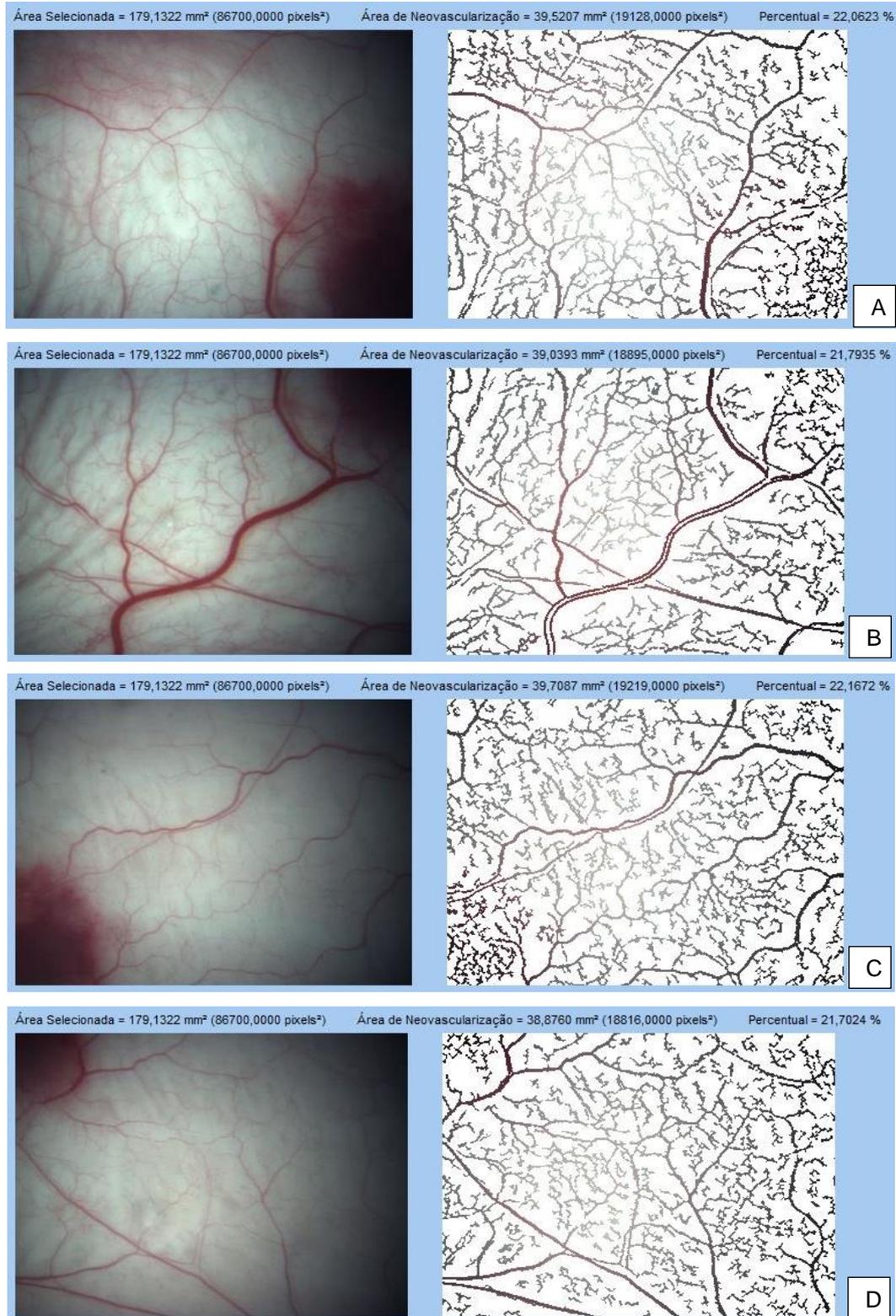
área vascular média (A_{vm}) dos valores dos quadrantes, em pixels (px) e em termos percentuais (%).

Figura 7 – A – Fotomicrografia do tumor em bolsa jugal panorâmica (aumento 10x). B, C, D, E – Fotomicrografias dos quadrantes (aumento 16x).



Fonte: Próprio autor.

Figura 8 – A, B, C, D - Quantificação da área de vascularização dos quadrantes a partir das imagens digitais (aumento 16x) com o software SQAN (Sistema de Quantificação de Angiogênese).



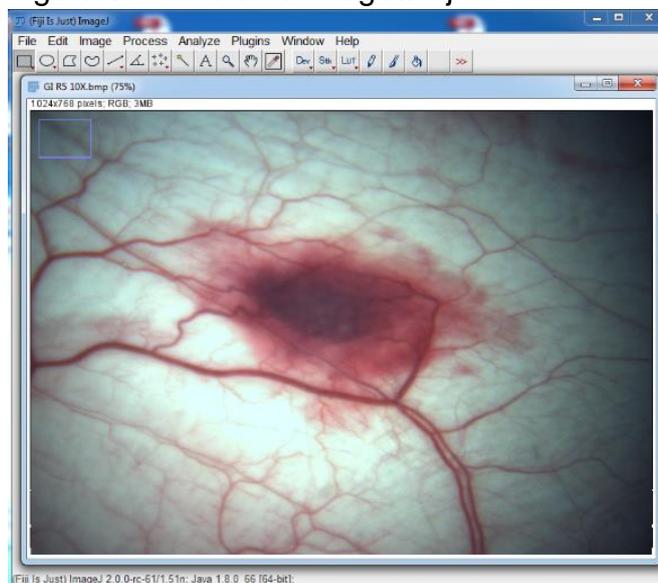
Fonte: Próprio autor.

3.6 Área e perímetro tumoral

A área e perímetro tumoral foram determinados em imagens digitais panorâmicas do tumor, com aumento de 4x, 6x ou 10x. As imagens foram capturadas com câmera acoplada ao microscópio cirúrgico e o aumento foi selecionado dependendo da dimensão tumoral.

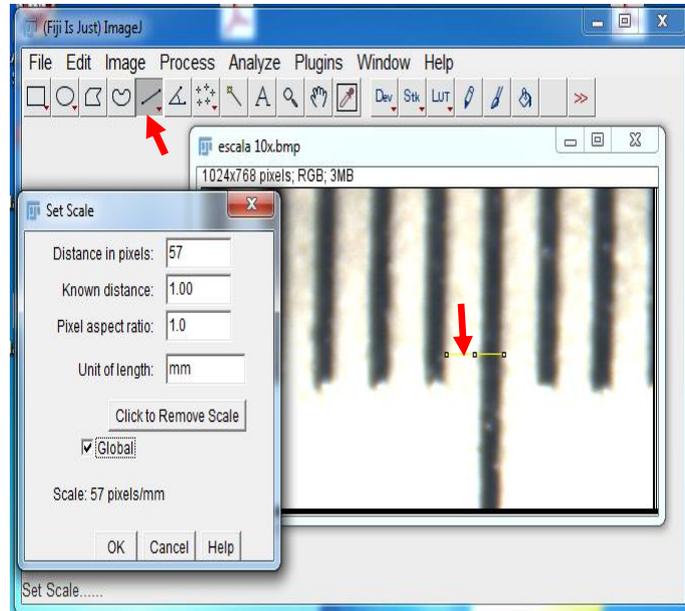
As medidas de área e perímetro tumoral foram obtidas com o *software* livre ImageJ/Fiji® (SCHINDELIN, *et al.* 2012) (Figura 9). As imagens digitais geradas pelo programa de captura da câmera fotográfica acoplada foram, primeiramente, submetidas a calibração de escala com base na imagem de régua milimétrica capturada nos respectivos aumentos das imagens analisadas (4x, 6x ou 10x). No procedimento de calibração, informa-se o valor em milímetros correspondente aos pixels de uma reta traçada em cima de uma distância conhecida da imagem em aumento específico (Figura 10). A calibração resultante desse procedimento foi utilizada para todas as fotos do mesmo aumento, de modo que, para cada aumento diferente, o programa foi recalibrado com o mesmo aumento. Uma vez feita a calibração da escala, os tumores foram contornados com a ferramenta *Freehand selections* e, em *Set measurements*, foram selecionadas as medidas *Área* e *Perímetro* (Figura 11). Em seguida, na barra de ferramentas, em *Analyze*, foi selecionada a opção *Measurement*, para gerar os valores das medidas selecionadas.

Figura 9 – Ambiente ImageJ/Fiji.



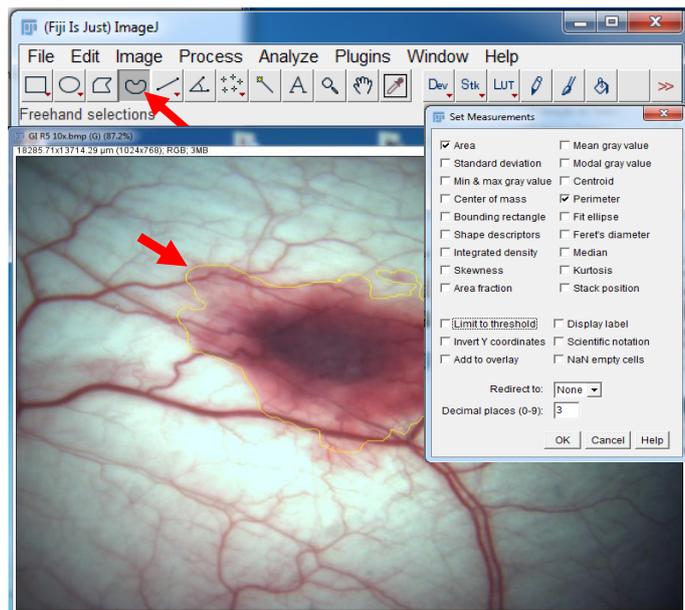
Fonte: Próprio autor.

Figura 10 – Calibração da escala traçando uma linha com a ferramenta ‘*straight*’ sobre uma distância conhecida.



Fonte: Próprio autor.

Figura 11 – Área tumoral contornada com a ferramenta Freehand selections e medidas selecionadas.



Fonte: Próprio autor.

3.7 Variação de peso corporal

Os animais foram pesados, semanalmente, durante todo o período experimental. Foi calculada a variação de peso corporal, em termos percentuais, conforme a formula (1).

$$\text{Variação de peso corporal } (\Delta P_c) = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{Peso final}} \times 100 \quad (1)$$

3.8 Peso relativo dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, foram coletados pulmão, fígado e baço. Os órgãos foram pesados e fixados em formalina tamponada 10%. Posteriormente, foi investigada a existência de metástase tumoral nesses órgãos.

O peso relativo, em termos percentuais, dos animais foi calculado com relação ao peso vivo do animal do último dia do experimento, conforme a formula (2).

$$\text{Peso relativo do órgão} = \frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso vivo}} \times 100 \quad (2)$$

3.9 Estatística

As variáveis quantitativas (contínuas e discretas) foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio-padrão (dados paramétricos). Em cada braço do estudo (grupos I, II, III, IV e grupos V, VI, VII, VIII), comparações entre os quatro grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares ou do teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas).

Em todas as análises, empregaram-se testes bicaudais, estabelecendo-se o nível de significância em 5% ($p < 0,05$). O *software* GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Exclusão de animais

Durante o experimento, foram excluídos ao todo seis animais por erro no procedimento do inóculo tumoral, dos quais três receberam o inóculo muito próximo a fibras musculares, ocasionando invasão da musculatura da maxila, e outros três a suspensão tumoral vasou, culminando em não crescimento do tumor (Apêndice B). Não houve mortalidade durante o período experimental.

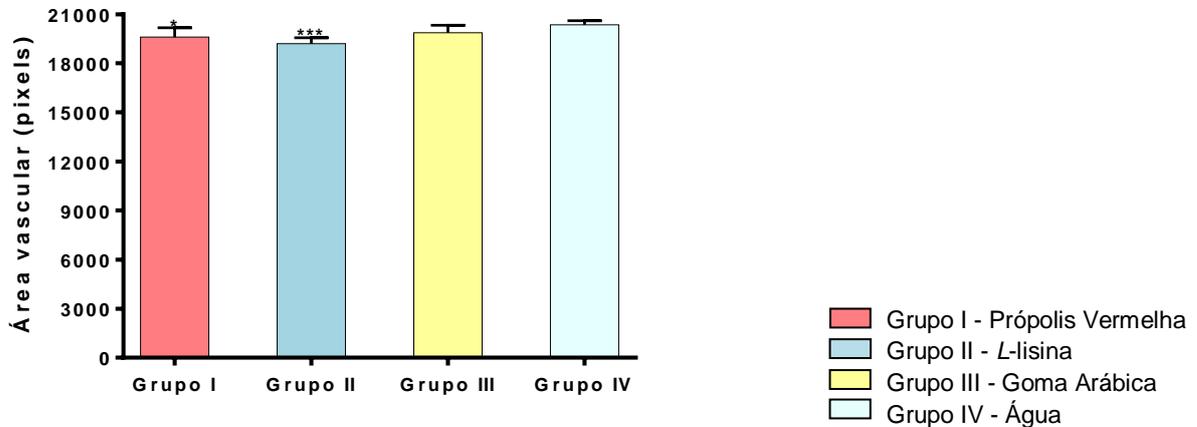
4.2 Avaliação da angiogênese tumoral

4.2.1 Área de vascularização dos grupos I, II, III, IV

A avaliação da angiogênese, por meio da área vascular média (A_{Vm}) dos quatro quadrantes, expressa em pixels (Figura 12) e em termos percentuais (Figura 13), mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo I (própolis vermelha) e grupo IV (controle), e entre o grupo II (*L*-lisina) e grupo IV (controle), grupos tratados por dez dias após o inóculo tumoral. Os dados correspondem à média e ao desvio-padrão das medições efetuadas em seis animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os quatro grupos, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

Os valores de média e desvio-padrão de A_{Vm} , expressos em pixel e termos percentuais, de medições efetuadas em seis animais de cada grupo (I, II, III e IV) e a comparação dos grupos com análise de variância, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, estão na Tabela 1.

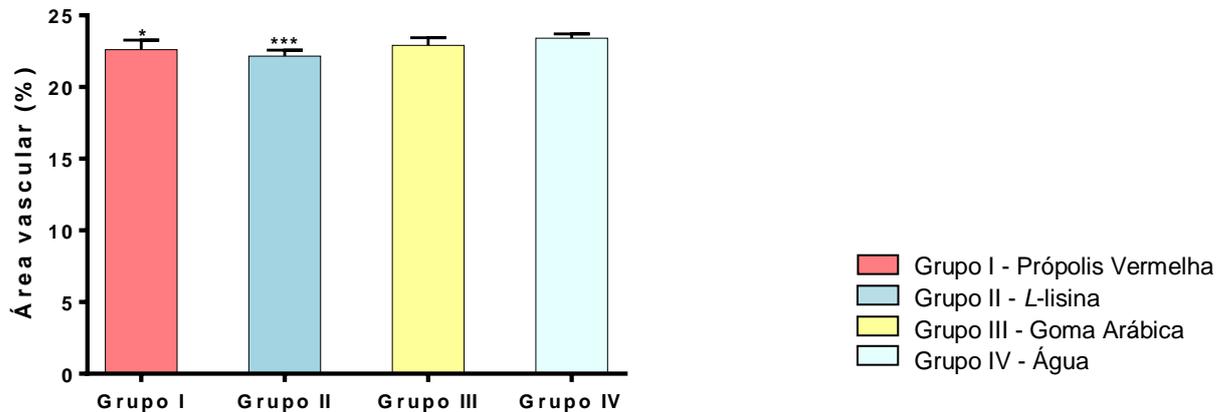
Figura 12 – Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em pixels, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: A_{Vm} mensurada no grupo I (* $p < 0,05$) e no grupo II (***) $p < 0,001$) foi significativamente menor que A_{Vm} verificada no grupo IV.

Figura 13 – Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em termos percentuais, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: A_{Vm} mensurada no grupo I (* $p < 0,05$) e no grupo II (***) $p < 0,001$) foi significativamente menor que A_{Vm} verificada no grupo IV.

Tabela 1 – Área vascular média (A_{Vm}) dos quatro quadrantes, expressa em pixels (px) e em termos percentuais (%), dos grupos da própolis (I), L-lisina (II), goma arábica (III) e água (IV), tratados por dez dias após o inóculo tumoral.

A_{Vm}	Grupo I Média ± DP (n)	Grupo II Média ± DP	Grupo III Média ± DP	Grupo IV Média ± DP	Significância (ANOVA)
Px	19598,79 ± 575,47 ^a (6)	19205,00 ± 362,16 ^b (6)	19861,40 ± 461,82 (6)	20352,58 ± 256,53 (6)	$p = 0,0015$
%	22,61 ± 0,66 ^a (6)	22,15 ± 0,42 ^b (6)	22,91 ± 0,53 (6)	23,47 ± 0,29 (6)	$p = 0,0015$

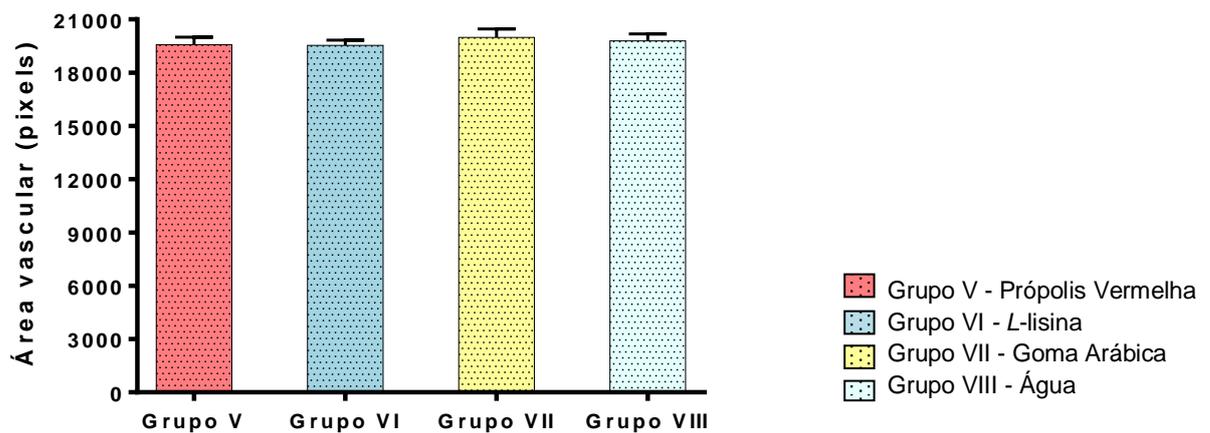
Fonte: Próprio autor.

Legenda: DP – Desvio-padrão. n – Número de animais. As letras ^a($p < 0,05$), ^b($p < 0,001$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo IV.

4.2.2 Área de vascularização dos grupos V, VI, VII e VIII

Na avaliação da angiogênese, por meio da determinação da área vascular média (A_{Vm}) dos quatro quadrantes, expressa em pixels (Figura 14) e em termos percentuais (Figura 15), dos grupos V, VI, VII, VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os dados correspondem à média e ao desvio-padrão das medições efetuadas em sete animais dos grupos V, VII e VIII e seis animais do grupo VI. A análise de variância foi usada para comparar os quatro grupos de tratamento, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

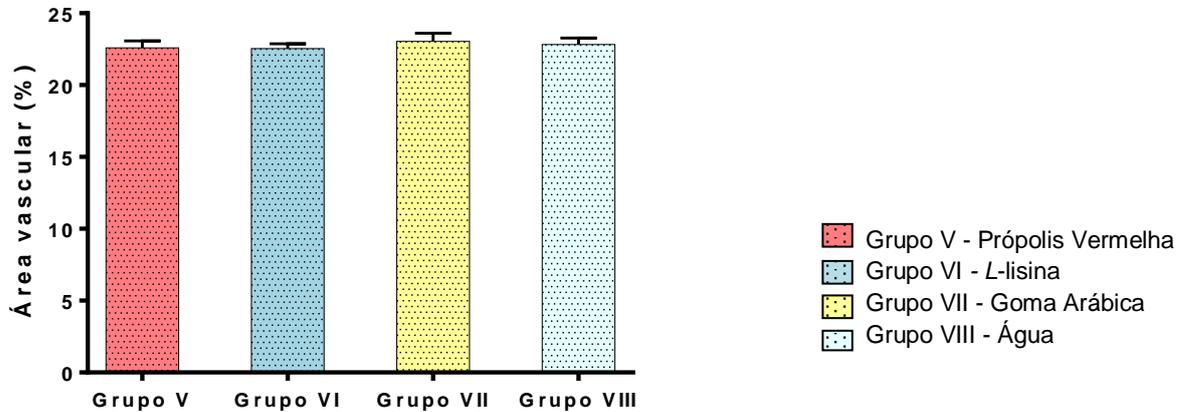
Figura 14 – Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em pixels, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 1,6958$; $p = 0,1957$).

Figura 15 - Área vascular média (A_{Vm}) dos quadrantes, expressa em termos percentuais, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 1,6957$; $p = 0,1958$).

Os valores de média e desvio-padrão de A_{Vm} , expressos em pixel e termos percentuais, de medições efetuadas em sete animais dos grupos V, VII e VIII e seis animais do grupo VI e a comparação dos grupos com análise de variância, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Área vascular média (A_{Vm}) dos quatro quadrantes, expressa em pixels (px) e em termos percentuais (%), dos grupos da própolis (V), L-lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII), tratados 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.

A_{Vm}	Grupo V Média ± DP (n)	Grupo VI Média ± DP (n)	Grupo VII Média ± DP (n)	Grupo VIII Média ± DP (n)	Significância (ANOVA)
Px	19580,21 ± 419,96 (7)	19539,63 ± 291,07 (6)	19980,23 ± 480,86 (7)	19792,82 ± 393,77 (7)	$p = 0,1957$
%	22,58 ± 0,48 (7)	22,54 ± 0,34 (6)	23,05 ± 0,55 (7)	22,83 ± 0,45 (7)	$p = 0,1958$

Fonte: Próprio autor.

Legenda: DP – Desvio-padrão. n – Número de animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

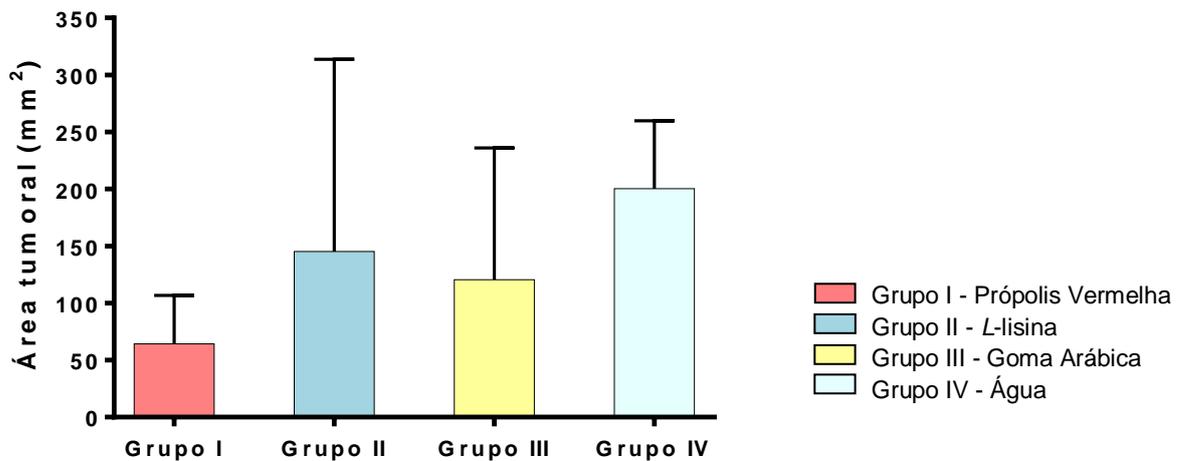
A média de área vascular dos quatro quadrantes, expressa em pixels e em termos percentuais, de cada animal dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, está no Apêndice C.

4.3 Avaliação do tamanho tumoral

4.3.1 Área e perímetro tumoral dos grupos I, II, III, IV

A avaliação do tamanho do tumor, por meio da determinação da área tumoral (A_{Tu}) (Figura 16) e do perímetro tumoral (P_{Tu}) (Figura 17), expresso em mm^2 e mm, respectivamente, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral, não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Os dados correspondem à média e ao desvio-padrão das medições efetuadas em seis animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os quatro grupos, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

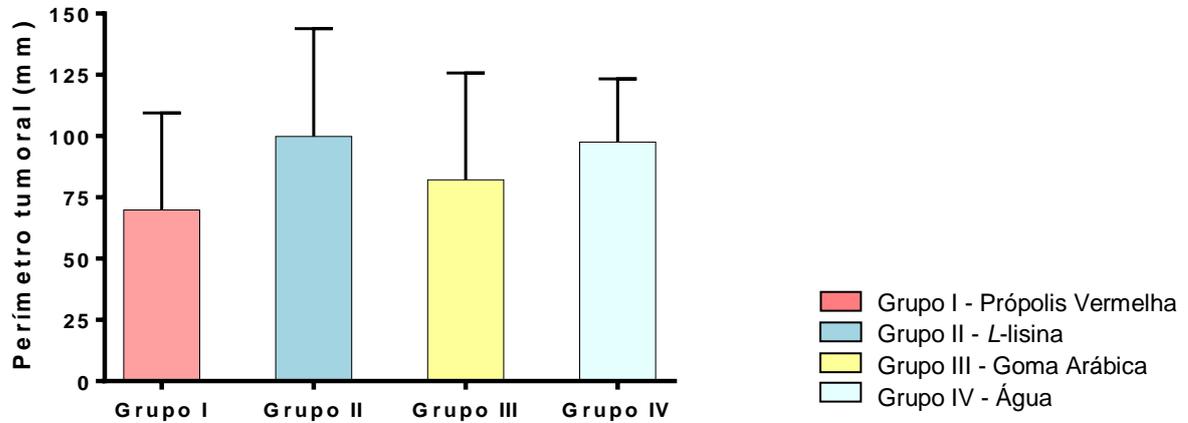
Figura 16 – Área tumoral (A_{Tu}), expressa em mm^2 , dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 1,6231$; $p = 0,2156$).

Figura 17 – Perímetro tumoral P_{Tu} , expresso em mm, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 0,7818$; $p = 0,5180$).

Os valores de média e desvio-padrão da área (A_{Tu}) e do perímetro (P_{Tu}) tumorais, expressos em mm^2 e mm, respectivamente, de medições efetuadas em seis animais de cada grupo (I, II, III e IV), e a comparação dos grupos com análise de variância, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Área tumoral (A_{Tu}) e perímetro tumoral (P_{Tu}), expressos em mm^2 e mm, respectivamente, dos grupos da própolis (I), L-lisina (II), goma arábica (III) e água (IV), tratados por dez dias após o inóculo tumoral.

Tamanho do tumor	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Significância (ANOVA)
	Média \pm DP (n)	Média \pm DP (n)	Média \pm DP (n)	Média \pm DP (n)	
A_{Tu}	64,34 \pm 42,46 (6)	145,18 \pm 168,49 (6)	120,59 \pm 115,52 (6)	200,35 \pm 59,57 (6)	$p = 0,2156$
P_{Tu}	69,90 \pm 39,57 (6)	99,90 \pm 43,96 (6)	82,12 \pm 43,68 (6)	97,54 \pm 25,77 (6)	$p = 0,5180$

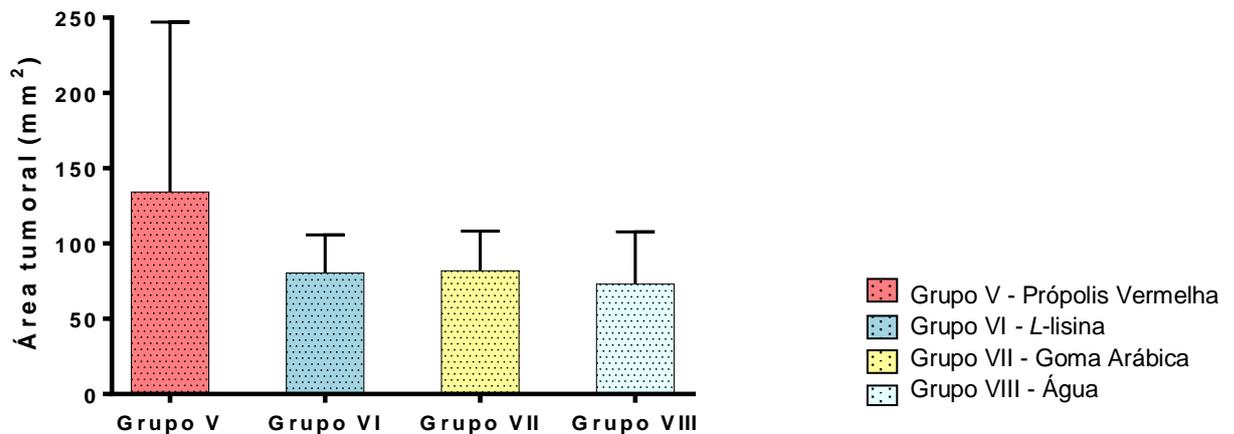
Fonte: Próprio autor.

Legenda: DP – Desvio-padrão. n – Número de animais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

4.3.2 Área e perímetro tumoral dos grupos V, VI, VII e VIII

Na avaliação do tamanho do tumor, por meio da determinação da área tumoral (A_{Tu}) (Figura 18) e do perímetro tumoral (P_{Tu}) (Figura 19), expresso em mm^2 e mm, respectivamente, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento e seus respectivos controles. Os dados correspondem à média e ao desvio-padrão das medições efetuadas em sete animais dos grupos V, VII e VIII e seis ratos do grupo VI. A análise de variância foi usada para comparar os quatro grupos de tratamento, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

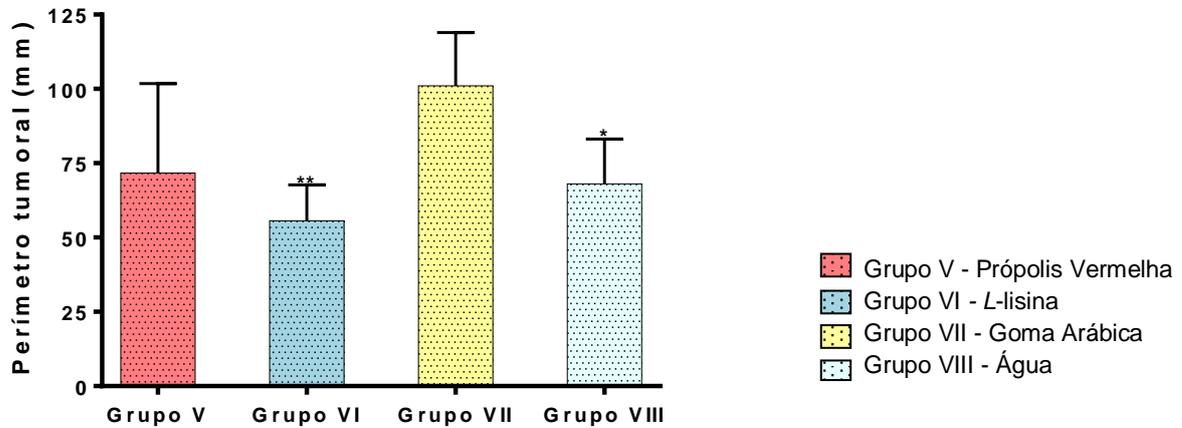
Figura 18 - Área tumoral (A_{Tu}), expressa em mm^2 , dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: A_{Tu} – área tumoral. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 1,3891$; $p = 0,2713$).

Figura 19 – Perímetro tumoral (P_{Tu}), expresso em mm, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: P_{Tu} - perímetro tumoral. Constatou-se que o perímetro tumoral mensurado no grupo VI (** $p < 0,01$) e no grupo VIII (* $p < 0,05$) foi significativamente menor que o verificado no grupo VII.

Os valores de média e desvio-padrão da área (A_{Tu}) e do perímetro (P_{Tu}) tumorais, expressos em mm^2 e mm, respectivamente, de medições efetuadas em sete animais dos grupos V, VII e VIII e seis animais do grupo VI, e a comparação dos grupos com análise de variância, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, estão na Tabela 4.

Tabela 4 – Área tumoral (A_{Tu}) e perímetro tumoral (P_{Tu}), expressos em mm^2 e mm, respectivamente, dos grupos da própolis (V), L-lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII), tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.

Tamanho do tumor	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Grupo VIII	Significância (ANOVA)
	Média ± DP (n)	Média ± DP (n)	Média ± DP (n)	Média ± DP (n)	
A_{Tu}	134,25 ± 112,83 (7)	80,49 ± 25,34 (6)	81,92 ± 26,28 (7)	73,13 ± 34,63 (7)	$p = 0,2713$
P_{Tu}	71,75 ± 30,03 (7)	55,62 ± 12,05 (6) ^a	101,00 ± 17,92 (7)	68,07 ± 15,02 (7) ^b	$p = 0,0035$

Fonte: Próprio autor.

Legenda: DP – Desvio-padrão. n – Número de animais. As letras ^a($p < 0,01$) e ^b($p < 0,05$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo VII.

Os valores de área e perímetro tumorais, de cada animal dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII do estudo estão, no Apêndice D.

4.4 Variação de peso corporal e peso relativo dos órgãos

A variação de peso corporal, em termos percentuais, bem como o peso relativo dos órgãos, dos grupos I (própolis vermelha), II (*L*-lisina), III (goma arábica) e IV (água), tratados por dez dias após o inóculo tumoral, estão na tabela 5. Os dados correspondem à média e ao desvio-padrão dos pesos de seis animais de cada grupo. Foi usada análise de variância para comparar os quatro grupos, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey ou ao Teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas).

Tabela 5 – Variação de peso corporal (ΔP_c) e relativo do pulmão (P_P), fígado (P_F) e baço (P_B), dos grupos da própolis (I), *L*-lisina (II), goma arábica (III) e água (IV), tratados por dez dias após o inóculo tumoral.

Peso	Grupo I Média ± DP (n)	Grupo II Média ± DP (n)	Grupo III Média ± DP (n)	Grupo IV Média ± DP (n)	Significância (ANOVA)
ΔP_c	2,49 ± 1,68 ^a (6)	12,59±6,38 ^{b,c} (6)	5,52 ± 1,67 (6)	4,03 ± 2,44 (6)	$p = 0,0005$
P_P	0,54 ± 0,098 (6)	0,54 ± 0,090(6)	0,64 ± 0,071 (6)	0,50 ± 0,15 (6)	$p = 0,1562$
P_F	3,2 ± 0,70 (6)	4,0 ± 0,40 ^d (6)	2,9 ± 0,42 (6)	3,2 ± 0,76 (6)	$p = 0,0440$
P_B	0,27 ± 0,049 (6)	0,23 ± 0,044 (6)	0,27 ± 0,071 (6)	0,23 ± 0,073 (6)	$p = 0,5210$

Próprio autor.

Legenda: DP – desvio-padrão. As letras ^a($p < 0,0005$), ^b($p < 0,01$), ^c($p < 0,005$) e ^d($p < 0,05$) representam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo ao grupo II, grupo III, grupo IV, e grupo III, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao peso do pulmão e do baço ($F=1,9$ e $F=0,78$, respectivamente).

A variação de peso corporal, em termos percentuais, bem como o peso relativo dos órgãos, dos grupos V (própolis vermelha), VI (*L*-lisina), VII (goma arábica) e VIII (água), tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral, estão na tabela 6. Os dados correspondem à média e ao desvio-padrão dos pesos de sete animais dos grupos V, VII e VIII e de seis animais do grupo VI. Foi usada Análise de

Variância para comparar os quatro grupos, associada ao Teste de Comparações Múltiplas de Tukey.

Tabela 6 – Variação de peso corporal (ΔP_c) e peso relativo do pulmão (P_P), fígado (P_F) e baço (P_B), dos grupos da própolis (V), L-lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII), tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.

Peso	Grupo V Média \pm DP (n)	Grupo VI Média \pm DP (n)	Grupo VII Média \pm DP (n)	Grupo VIII Média \pm DP (n)	Significância (ANOVA)
ΔP_c	27,38 \pm 5,16 (7)	32,06 \pm 3,30 ^a (6)	25,54 \pm 2,70 (7)	22,78 \pm 5,41 (7)	$p = 0,0070$
P_P	0,57 \pm 0,070 ^{b,c} (7)	0,66 \pm 0,11 (6)	0,74 \pm 0,067 (7)	0,71 \pm 0,053 (7)	$p = 0,0018$
P_F	4,0 \pm 0,29 (7)	4,4 \pm 0,35 (6)	4,3 \pm 0,34 (7)	4,0 \pm 0,45 (7)	$p = 0,1549$
P_B	0,23 \pm 0,030 ^d (7)	0,26 \pm 0,035 ^e (6)	0,45 \pm 0,12 ^f (7)	0,33 \pm 0,062 (7)	$p < 0,0001$

Próprio autor.

DP – Desvio-padrão. As letras ^a($p < 0,005$), ^b($p < 0,005$), ^c($p < 0,01$), ^d($p < 0,0001$) e ^e($p < 0,001$) e ^f($p < 0,05$) representam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo VIII, grupo VII, grupo VIII, grupo VII, grupo VII e grupo VIII, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao peso do fígado ($F=1,9$).

Os pesos individuais dos animais de cada grupo estão no Apêndice E, enquanto pesos do pulmão, fígado e baço de cada animal estão no Apêndice F. Gráficos complementares sobre a variação de peso estão no Apêndice G. A curva de ingesta das substâncias administradas está no Apêndice H.

5 DISCUSSÃO

A vascularização desempenha papel importante em muitas áreas de estudo, como aterosclerose, reparo tecidual, desenvolvimento, inflamação, doenças crônicas e, principalmente, no câncer. O estudo da neovascularização auge cada vez mais atenção dos cientistas e, atualmente, já estão claras muitas das características sobre a regulação do crescimento dos vasos sanguíneos, tanto no desenvolvimento e na fisiologia normal do organismo, como em sua condição patológica. Algumas terapias para induzir ou inibir a angiogênese já foram desenvolvidas, como o bevacizumab, um inibidor do VEGF, e os bloqueadores dos domínios da tirosina-quinase dos receptores na superfície das células vasculares (BIKFALVI, 2017). Nos tecidos tumorais, que contêm células não transformadas e componentes de matriz, em adição às células transformadas tumorais (característica da heterogeneidade tumoral), vários fatores interagem a nível molecular e celular, dentro do que é chamado de microambiente tumoral. Esse microambiente inclui células do sistema imunológico e inflamatórias, células do estroma, bem como as células endoteliais. Em conjunto, essas podem promover o crescimento tumoral em todos os estádios da carcinogênese (BRUNO *et al.*, 2014).

Uma série de modelos para investigar a angiogênese tumoral já foi desenvolvida, porém o modelo ideal deve se aproximar de condições reais em que o evento ocorre. Os principais modelos para o estudo da angiogênese são: ensaios *in vitro* 2D e 3D, ensaios *ex-vivo*, ensaio *in vivo* de implante de esponja, implante de matrigel, bolsa de ar dorsal, câmara transparente, *Angiomouse*® para estudo de tumores ortópicos, janela de mesentério, membrana corioalantoica (CAM), membrana de saco vitelino, angiogênese em córnea, *Zebrafish*, implante de tumor em tela subcutânea e bolsa jugal de hamster. Cada modelo desse traz uma série de variações que visam a viabilizar o acesso ao acompanhamento *in vivo* e a quantificação, bem como adaptação a várias situações em que o processo de angiogênese está envolvido.

Assim também o presente estudo é um modelo animal de bolsa jugal de hamster para estudar angiogênese tumoral. Inicialmente foi necessário estabelecer o modelo tumoral com o carcinossarcoma de Walker, obtendo-se uma quantidade mínima de células tumorais necessárias para o crescimento tumoral. A bolsa jugal, por ter função de armazenamento de alimentos, sofre constantemente estresse

mecânico, o que pode influenciar no crescimento tumoral e também na angiogênese, mas isso ocorre igualmente em todos os animais de todos os grupos. A formação de edema no local do inóculo evitou o vazamento do líquido e, assim, garantiu a viabilidade do modelo. Todos esses fatores, bem como a própria genética de cada animal, já que não foram usados animais singênicos, contribuíram para a variação no crescimento tumoral entre os animais. Isso é observado também quando se induz carcinogênese química, em que os animais normalmente exibem diferenças na evolução na formação do tumor e alguns não desenvolvem tumores, embora recebam a mesma dose de carcinógeno injetável.

A execução do procedimento de inóculo foi feito de modo bastante delicado para evitar possíveis acidentes, como vazamento da suspensão tumoral e inóculo muito próximo de fibras musculares. Acidentes, no entanto, ocorreram em alguns casos e esses animais foram excluídos do experimento, pois resultou em não crescimento do tumor ou invasão local do tumor, respectivamente. Estes acidentes podem ser explicados pela curva de aprendizado. Foram excluídos do estudo ao todo seis animais, sendo cinco pertencentes ao grupo II, três em que o tumor não cresceu e dois que o tumor invadiu, e um do grupo VI, em que o tumor invadiu. Ocorreu, entretanto, 100% de pega em todos os outros animais do estudo.

O modelo aqui descrito otimizou um outro de implante de fragmentos de carcinosarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster (SMITH, 1969), já que, conforme relatos do próprio autor, a não padronização do número de células pode levar a variações, gerando viés quando avaliada a evolução tumoral.

Em um grupo-piloto, realizado previamente ao experimento, foram determinados o número mínimo de células necessárias para o crescimento tumoral e o tempo de crescimento adequado em bolsa jugal de hamster. Esse tempo corresponde ao período de morbimortalidade do tumor descrito na literatura.

O procedimento de cauterização dos vasos sanguíneos com bisturi elétrico no ponto de fixação da bolsa jugal à cavidade oral do animal, com manutenção do sangue em seu interior, bem como a montagem a fresco e a fixação em fundo branco da bolsa jugal, para a captação de imagens dos vasos em microscópio estereoscópico, constituiu um novo método criado para a quantificação da angiogênese em bolsa jugal de hamster em imagens digitais.

Estudos que utilizaram o modelo de bolsa jugal como modelo para o estudo da angiogênese e da carcinogênese química induzida por DMBA avaliaram a

neovascularização por meio de alterações da expressão de componentes de vias de sinalização de angiogênese tumoral) (PRIYADARSINI *et al.*, 2009; NAGINI *et al.*, 2012; KAVITHA *et al.*, 2014; ZAID *et al.*, 2016). Também foi avaliada a densidade celular (contagem manual), como parâmetro para mensurar a força de compressão local nas paredes externas dos vasos, e a morfologia dos vasos, por meio dos parâmetros área, perímetro e proporção (P) entre os diâmetros maior e menor em cortes histológicas (com *software* ImageJ) (PADERA *et al.*, 2004; AROMANDO *et al.*, 2014), onde P é considerado um indicador de grau de compressão vascular, característica comum dos vasos neoplásicos, de modo que P igual a 1 representa um círculo perfeito e um vaso sem compressão (HAGENDOORN *et al.*, 2006; PADERA *et al.*, 2004; URSO *et al.*, 2016). Esses estudos, porém, não avaliaram a angiogênese por meio de imagens digitais capturadas em microscópio estereoscópico de tecido montado a fresco, como neste experimento.

O *software* SQAN, para avaliação da angiogênese por meio da análise de imagens digitais capturadas de tecido *in vivo*, com câmera acoplada ao microscópio estereoscópico, já foi utilizado em modelo de córnea de coelho (FECHINE-JAMACARU, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2012) e em implante subcutâneo de tumor de Walker (MORANO, 2009), para quantificação da angiogênese de maneira prática e rápida. Esse método de análise morfométrica da rede vascular em modelos de câncer experimental foi validado (FECHINE-JAMACARU, 2018).

A comparação entre os valores de área vascular média (A_{vm}), expressa em pixels (px) e em termos percentuais (%), mostrou que a angiogênese tumoral foi significativamente inibida apenas nos grupos tratados, por dez dias após o inóculo tumoral, com própolis (grupo I, $p < 0,05$) e L-lisina (grupo II, $p < 0,001$), quando comparados ao controle (grupo IV).

A comparação entre os valores de A_{vm} (px e %) dos grupos V (própolis vermelha), VI (L-lisina), VII (goma arábica) e VIII (água), que receberam as substâncias por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral, não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

A própolis vermelha brasileira de Alagoas, utilizada no estudo, foi submetida a investigação da sua atividade antioxidante, usando o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), mostrando resultados superiores ao do padrão vitamina C para o extrato etanólico e para as frações de acetato de etila e de metanol. Também foram isoladas do extrato etanólico de própolis

vermelha quatro isoflavonas (2'-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavana, 2',7-di-hidroxi-4'-metoxiisoflavana, 4',7-di-hidroxi-2'-metoxiisoflavana e 2',4'-di-hidroxi-7-metoxiisoflavana), uma chalcona (2',4',4-tri-hidroxichalcona) e um triterpeno (lup-20(29)-en-3-ol), já conhecidos na própolis vermelha (LEMOS *et al.*, 2018). Além disso, o estudo dos compostos fixos da fração hexânica da própolis revelou a existência de três ésteres, o hexadecanoato de metila (15,20%), o tetracosanoato de metila (10,40%) e o octadecanoato de metila (2,39%). E o estudo de determinação de fenóis totais no extrato etanólico de própolis vermelha exibiu um teor de compostos fenólicos de $133,3 \pm 4,35$ mg de EAG/g de amostra (AGUIAR, 2015). Esses dados deram suporte à utilização do extrato de própolis vermelha na investigação de sua possível atividade antiangiogênica.

A atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos da amostra de própolis utilizada neste estudo mostraram-se semelhantes ao que foi relatado na literatura (FROZZA *et al.*, 2013). Os efeitos antioxidantes de própolis vermelha foram atribuídos às chalconas e isoflavonoides que atuam como doadores de elétrons (RIGHI *et al.*, 2011). A atividade antioxidante de variados tipos de própolis e de seus compostos pode conferir efeito protetor em distintos contextos (DORNELAS *et al.*, 2014; BARBOSA BEZERRA *et al.*, 2017; BARBOSA *et al.*, 2016; NAKAJIMA *et al.*, 2007, 2009).

Diversos tipos de própolis mostraram atividade antiangiogênica *in vitro* e *in vivo* (MENEGHELLI *et al.*, 2013; SFORCIN, 2016). Em estudo com câncer de bexiga induzido por BBN, o tratamento com própolis verde extraída em *L*-lisina reduziu a densidade microvascular nos carcinomas de bexiga, quando comparado ao grupo-controle que recebeu apenas o carcinógeno (DORNELAS *et al.*, 2012a). O artepilin C (ARC) na própolis verde brasileira mostrou atividade antiangiogênica (AHN *et al.*, 2007). A própolis vermelha chinesa preveniu angiogênese induzida por VEGF em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), diminuindo a formação de tubo, proliferação e migração (IZUTA *et al.*, 2009). Própolis coreana inibiu a angiogênese, tanto em ensaios *in vitro* como em modelos *in vivo* (PARK *et al.*, 2014).

Em estudos *in vivo*, no entanto, com extrato de polifenóis de própolis verde (principais compostos artepilin C, pinocembrin, kaempferol), marrom (principais compostos pinocembrin, éster fenetil de ácido caféico, quercetin, galangin) e vermelha (principais compostos 3-hidroxi-8,9-dimetoxiptecarpan, medicarpi, daidezin), foi observado que o extrato de polifenóis de própolis vermelha foi o mais efetivo na

redução de lesões ateroscleróticas, em modelos de lesões ateroscleróticas iniciais (IAL) e avançadas (AAL), por meio de mecanismos que induzem a modulação da inflamação e de fatores angiogênicos. O extrato de polifenóis de própolis vermelha no modelo de IAL diminuiu a expressão de genes angiogênicos angiopoietina I e II, FGF, PDGF, VEGF, MMP-9, molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) e aumentou a expressão de TIMP-1 e, no modelo de AAL, diminuiu a expressão de PDGF, VEGF, MMP-9, PECAM-1 e aumentou a expressão de TIMP-1. Também modulou a expressão de genes aterogênicos, diminuiu as lesões ateroscleróticas e melhorou o perfil lipídico, tanto em AIL como AAL (DALEPRANE *et al.*, 2012a). Nesse estudo, os autores atribuem a intensa ação da própolis ao seu conteúdo rico em polifenóis. Tal ação, todavia, foi observada em um processo inflamatório e não em câncer.

Na extração da própolis vermelha deste estudo, foi utilizado etanol e, em seguida, solução aquosa de goma arábica a 1%. O extrato resultante mostrou efeito antiangiogênico.

O extrato de polifenóis de própolis vermelha mostrou efeito antiangiogênico, preveniu a migração de células endoteliais e diminuiu a diferenciação de células-tronco embrionárias em células CD-31-positivas (*in vitro*), reduziu o brotamento de células endoteliais (*ex vivo*) e diminuiu a formação de novos vasos sanguíneos (*in vivo*). Além disso, em condições de hipóxia *in vitro*, o extrato de polifenóis de própolis vermelha suprimiu a expressão da proteína Cdc42 (relacionada a diminuição de pVHL), aumentou a expressão de pVHL (degrada fator induzido por hipóxia - HIF-1 α) e, conseqüentemente, reduziu o acúmulo de HIF-1 α , suprimindo a expressão dos genes VEGF, ADM e GLUT1 (genes importantes na adaptação à hipóxia e regulados primariamente por HIF-1 α) (DALEPRANE *et al.*, 2012b). Foi considerado o fato de que a própolis vermelha tem efeito quimioprotetivo por atenuar angiogênese.

A própolis vermelha tem efeito antioxidante, pode reduzir VEGF e também HIF-1 α . A relação entre o estresse oxidativo e angiogênese está bem estabelecida, e, também, a relação entre estresse oxidativo e hipóxia tumoral (DALEPRANE; ABDALLA, 2013). Hipóxia pode influenciar angiogênese, resposta a tratamentos e metástase tumoral; HIF-1 é um fator de transcrição que contém as subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , que podem se heterodimerizar e ligar-se a regiões promotoras de genes envolvidos com angiogênese, adaptação metabólica à hipóxia, resistência ao estresse

oxidativo e aumento de propriedades invasivas (DEWHIRST, 2009). A correlação entre o efeito antiangiogênico de própolis com sua atividade antioxidante foi relatada em estudo *in vitro* com células endoteliais HUVEC, em que compostos isolados de própolis com maior efeito antiangiogênico mostraram maior atividade antioxidante, sugerindo também que a atividade angiogênica de flavonoides também depende de sua estrutura química (AHN *et al.*, 2009).

A própolis vermelha mostrou propriedade anti-inflamatórias com diminuição da regulação de fator nuclear κ B e redução de citocinas fator de crescimento transformador (TGF)- β , TNF- α , interleucina (IL)-6, IL-1 β (BUENO-SILVA, 2016; CORRÊA *et al.*, 2017), fatores que são importantes na angiogênese.

Quercetin e luteolin, flavonoides comumente encontrados na própolis vermelha, bem como derivado de quercetin e luteolin, exibiram efeito antiangiogênico por interferirem com a via de sinalização VEGF/VEGFR2 (PRATHEESHKUMAR *et al.*, 2012a, 2012b; RAVISHANKAR *et al.*, 2015).

Estudos com polifenóis de diversas fontes mostraram que sua ingestão pode reduzir a incidência de doenças associadas com o aumento da angiogênese, como o câncer (OAK *et al.*, 2005; RASHIDI *et al.*, 2017; SAGAR; YANCE; WONG, 2006).

Já com relação a *L*-lisina, a densidade microvascular dos tumores de ratos que receberam carcinógeno e *L*-Lisina, concomitantemente, por 40 semanas foi significativamente maior quando comparada ao grupo-controle, sendo questionado por aqueles autores se a angiogênese poderia ter gerado tumores maiores e mais invasivos observados no estudo. O dobro da dose de *L*-lisina administrada 18 semanas após a última semana de administração do carcinógeno, não mostrou, todavia, efeito na densidade microvascular (DORNELAS *et al.*, 2012a). Os achados deste estudo vão de encontro aos achados desses pesquisadores.

Já em outro estudo, o tratamento com *L*-lisina mostrou efeito antioxidante, com inibição de IL-6, redução de manolaldeído (MDA) e NO, e aumento de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase, em modelo de pancreatite *in vivo* (AL-MALKI, 2015). Por outro lado, a administração de altas doses de *L*-lisina (2,0 g/kg) induz pancreatite necrosante aguda severa, mostrando efeito danoso seletivo em mitocôndrias do pâncreas, não tendo efeito danoso em mitocôndrias do fígado. Os autores discutiram que isso decorreu das diferenças entre mitocôndrias desses órgãos (BICZÓ *et al.*, 2011).

Com efeito, observa-se que a dose e o tempo de tratamento, bem como a seletividade de ação, têm influência sobre o efeito da *L*-lisina.

Quanto à avaliação do tamanho tumoral em plano único, por meio da área tumoral A_{Tu} (mm²) e do perímetro tumoral P_{Tu} (mm), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais de própolis e *L*-lisina e seus respectivos controles. Esses resultados, todavia, refletem o tamanho da superfície do tumor em plano único, e sabe-se que, apesar da diminuta espessura, alguns tumores se mostravam à imagem estereoscópica um pouco mais espessos do que outros.

Há, principalmente, três tipos de própolis que contêm componentes antitumorais totalmente diferentes: éster fenetil de ácido cafeico (CAPE) de própolis verde, ARC de própolis verde brasileira e alguns constituintes da própolis vermelha brasileira (MESSERLI *et al.*, 2009). O extrato de própolis verde brasileira inibiu a carcinogênese de bexiga induzida por BBN em ratas, quando administrada 30 dias antes do carcinógeno (DORNELAS *et al.*, 2012b).

Extrato metanólico de própolis vermelha brasileira e (6aR,11aR)-3,8-dihidroxi-9-meto-xipterocarpan (composto isolado da própolis vermelha) mostraram citotoxicidade para células de câncer de pâncreas humano PANC-1 em condição de privação nutricional, sendo o mecanismo de morte celular por uma via não apoptótica com mudanças morfológicas do tipo necróticas, não acompanhado de fragmentação de DNA (AWALE *et al.*, 2008).

Própolis vermelha *in vitro* induziu apoptose em linhagem de célula de câncer de mama (MCF-7) (KAMIYA *et al.*, 2012), mostrou atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humanas (HeLa e Hep2) (FROZZA *et al.*, 2013), em células de carcinoma de bexiga humano (linhagem 5637) (BEGNINI *et al.*, 2014), em células câncer de próstata PC-3 (ZHANG *et al.*, 2014) e linhagens SF-295, OVCAR-8 e HCT-116 (de MENDONÇA *et al.*, 2015).

Também foi estudado o efeito na expressão diferencial de proteínas em células tumorais Hep-2 *in vitro*, após tratamento com própolis vermelha, havendo-se identificado a regulação de proteínas envolvidas, direta ou indiretamente, nos mecanismos de sinalização de células cancerosas (FROZZA *et al.*, 2014; DA SILVA FROZZA *et al.*, 2016).

Compostos isolados ou frações da própolis vermelha contendo formononetin, biochanina A, mucronulatol, liquiritigenin, xantoquimol, (2S)-7-hidroxi-6-

metoxiflavanone, vestitol, neovestitol, dentre outros, mostraram atividade antiproliferativa, podendo ter efeitos mais expressivos quando comparados ao extrato de própolis vermelha (LI *et al.*, 2008; HU; XIAO, 2015; FROZZA *et al.*, 2017; NANI *et al.*, 2018).

A própolis vermelha, em tratamentos *in vivo*, exibiu efeito modulador na formação, diferenciação e progressão de carcinoma de células escamosas induzido por 9,10-dimetil-1,2-benzatraceno (DMBA) (PINHEIRO *et al.*, 2014), e, também, *in vivo*, inibiu crescimento de carcinoma oral de células escamosas induzido por DMBA, com efeito quimiopreventivo na progressão de displasia epitelia para invasão de carcinoma de células escamosas de cavidade oral (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Esses estudos mostram, no entanto, que os testes *in vitro* exibem resultados mais satisfatórios do que os estudos *in vivo*, já que o efeito citotóxico de própolis vermelha ou de componentes isolados pode chegar a 100%, enquanto o efeito de inibição do crescimento tumoral *in vivo* dos estudos citados não chega a 50%. Alguns fatores podem ser responsáveis por essa diferença, como o metabolismo e as interações fisiopatológicas das substâncias administradas no organismo. O extrato de própolis mostrou efeito antioxidante *in vivo*, enquanto polifenóis de própolis (antioxidantes *in vitro*) administrados isolados, não tiveram o mesmo resultado. Tal efeito ocorre em razão da baixa absorção desses polifenóis quando administrados isoladamente, porém esses polifenóis têm maior biodisponibilidade quando administrados no extrato de própolis (BOUFADI *et al.*, 2018).

Nos resultados deste estudo mostramos o efeito anti-angiogênico do extrato de própolis vermelha, mas não se sabe qual composto ou quais compostos foram responsáveis por tal efeito. Compostos isolados ou frações da própolis vermelha concentrados teriam efeito anti-angiogênico e/ou anti-tumoral mais expressivo no carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster?

Variados tipos de extração da própolis, e mesmo as variações na composição de amostras de própolis distintas podem influenciar em sua atividade, bem como a variação de modelos para o estudo do câncer pode conduzir a resultados diversos.

Além disso, já foi mostrado que extratos de própolis e polifenóis de várias fontes podem exibir duplo efeito, dependendo da concentração e também da seletividade em sua ação, por exemplo, tendo efeito citotóxico contra células de câncer e não contra células normais. De Mendonça *et al.* (2015), em estudo com

citotoxicidade de linhagens de células tumorais *in vitro*, observaram que a própolis vermelha mostrou efeito citoprotetor, em concentrações até 12,5 µg/ml, e efeito citotóxico em concentrações de 20 µg/ml e 50 µg/ml, quando comparado ao controle negativo, sugerindo que o efeito citoprotetor de doses mais baixas decorre da atividade antioxidante da própolis.

Alguns estudos mostram a ação significativa de extrato de própolis como adjuvante em tratamento quimioterápico, mostrando efeitos protetivos apenas para células normais (BENKOVIĆ, 2008; ORŠOLIĆ *et al.*, 2010).

Em estudo de indução de criptas aberrantes por 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) foi constatado que, apesar de o extrato de própolis não ter efeito na formação dos focos de criptas aberrantes, modulou o dano ao DNA induzido pelo DMH em concentração mais alta, e em concentrações mais baixas, reduziu o dano ao DNA (de LIMA *et al.*, 2005).

Um estudo com extrato de própolis portuguesa evidenciou que concentrações mais baixas tem efeito antigenotóxico, enquanto concentrações mais elevadas têm efeito genotóxico, o que se correlaciona com a citotoxicidade de altas concentrações de extrato. Este duplo efeito pode ser explicado pela ação de compostos que interferem na síntese de DNA e / ou a proliferação celular, juntamente com antioxidantes (CRUZ *et al.* 2016).

Os resultados observados neste estudo não descartam a possibilidade de a própolis ter efeitos antitumorais. Uma variação do método de extração da própolis poderia levar a resultados diferentes dos observados? Uma concentração maior do extrato de própolis vermelha teria efeito antitumoral para o carcinosarcoma de Walker no modelo de bolsa jugal de hamster? Obter um extrato concentrado de polifenóis seria efetivo contra o crescimento de tumor de Walker em bolsa jugal de hamster? Um tempo de tratamento mais prolongado poderia levar a outros resultados?

Em estudo experimental de câncer de bexiga induzido por BBN, todos os animais tratados com *L*-lisina, concomitantemente, com o carcinógeno, desenvolveram carcinomas mais invasivos quando comparados aos animais do grupo-controle. Os animais que receberam, no entanto, somente a *L*-lisina por 40 semanas não desenvolveram câncer, indicando que a dose administrada não induz a carcinogênese, mas pode promovê-la (DORNELAS *et al.*, 2012b).

Além disso, a *L*-lisina mostrou proteção contra genotoxicidade, em medula óssea e sangue periférico, quando administrada, concomitantemente, com o BBN, e

reverteu o efeito genotóxico do BBN, quando administrada semanas após o carcinógeno (DORNELAS *et al*, 2014).

L-lisina não mostrou, no entanto, promoção da carcinogênese em modelos de carcinogênese de bexiga em ratos submetidos a ureterossigmoidostomia e vesicosigmoidostomia (DORNELAS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016). *L*-lisina, entretanto, acelerou o desenvolvimento de metaplasia transicional em epitélio intestinal em ratos submetidos a cistoplastia colovesical (SANTOS *et al.*, 2017).

A literatura relata ‘duplo efeito’ ou ‘seletividade’, tanto para a própolis como para a *L*-lisina, em contextos distintos, e dependente de dose.

Com relação ao peso dos animais, *L*-lisina aumentou significativamente a variação de peso corporal do grupo II ($p < 0,005$) e do grupo VI ($p < 0,005$), quando comparados aos seus respectivos controles (grupos IV e VIII). Já com relação ao peso relativo dos órgãos, apenas o grupo experimental V ($p < 0,01$) houve diferença estatisticamente significativa do peso relativo do pulmão (P_p), quando comparado ao seu respectivo grupo-controle (grupo VIII).

6 CONCLUSÕES

O modelo de inóculo de carcinossarcoma de Walker foi estabelecido com cem por cento de pega tumoral no subepitélio jugal.

O método de exposição da bolsa jugal para captação de imagens digitais para a quantificação da angiogênese mesoscópica e da área e perímetro tumoral, em plano único, foi criado com sucesso.

A própolis vermelha inibiu a angiogênese em carcinossarcoma de Walker em subepitélio de bolsa jugal de hamster, quando administrada após o inóculo tumoral.

A *L*-lisina inibiu a angiogênese em carcinossarcoma de Walker em subepitélio de bolsa jugal de hamster, quando administrada após o inóculo tumoral.

Não foram encontrados efeitos da própolis vermelha e da *L*-lisina sobre a área e perímetro tumoral do carcinossarcoma de Walker.

Considerações finais

Neste estudo foram avaliados os efeitos da própolis vermelha e da *L*-lisina na angiogênese tumoral e no carcinossarcoma de Walker implantado em bolsa jugal de hamster. Para isso, foi criado e estabelecido um modelo de estudo da angiogênese tumoral de inóculo de células de carcinossarcoma de Walker. Também foi elaborado método de exposição da bolsa jugal para quantificação mesoscópica de angiogênese, para captação de imagens digitais e análise com o *software* SQAN, específico para o estudo da angiogênese. Quatro grupos foram tratados (própolis vermelha, *L*-lisina, goma arábica e água, respectivamente) por dez dias após o inóculo do tumor de Walker e outros quatro grupos (própolis vermelha, *L*-lisina, goma arábica e água, respectivamente) receberam as substâncias por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral. No estudo dos grupos que receberam própolis vermelha e *L*-Lisina após o inóculo, a avaliação da angiogênese, por meio da área vascular média (A_{Vm}) dos quatro quadrantes, expressa em pixels e em termos percentuais, constatou que a A_{Vm} mensurada no grupo da própolis ($p < 0,05$) e no grupo da *L*-lisina ($p < 0,001$) foi significativamente menor do que A_{Vm} mensurada no grupo da água. Na avaliação da angiogênese nos grupos que receberam substâncias 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral por meio da determinação da A_{Vm} dos quatro quadrantes, expressa em pixels e em termos percentuais, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Na avaliação dos grupos tratados por dez dias após o inóculo tumoral, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nem para os valores de A_{Tu} , e tampouco para P_{Tu} . Já na comparação entre os grupos tratados com própolis vermelha e *L*-lisina por dez dias antes e 33 dias após o inóculo tumoral, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os valores de A_{Tu} e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre grupos experimentais e seus controles para valores de P_{Tu} . A própolis e a *L*-lisina, quando administradas após o inóculo tumoral, nas doses e tempos administrados, inibiram a angiogênese tumoral.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-QADIR, H. et al. Cardiovascular toxicity of angiogenesis inhibitors in treatment of malignancy: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treat Rev**, v. 53, p. 120-127, Feb 2017. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104567> >.
- AGUIAR, G. R. **Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas**. 2015. (Mestrado). Departamento de Química orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- AHMED, Z.; BICKNELL, R. Angiogenic signalling pathways. **Methods Mol Biol**, v. 467, p. 3-24, 2009. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19301662> >.
- AHN, M. R. et al. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. **Mol Nutr Food Res**, v. 53, n. 5, p. 643-51, May 2009. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19065585> >.
- _____. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artemillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Lett**, v. 252, n. 2, p. 235-43, Jul 2007. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17343983> >.
- AHN, Y. C. et al. Multimodality approach to optical early detection and mapping of oral neoplasia. **J Biomed Opt**, v. 16, n. 7, p. 076007, Jul 2011. ISSN 1560-2281. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21806268> >.
- AL-MALKI, A. L. Suppression of acute pancreatitis by L-lysine in mice. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 193, Jun 2015. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100532> >.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **J Ethnopharmacol**, v. 113, n. 2, p. 278-83, Sep 2007. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656055> >.
- ALVES, A. P. et al. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. **Acta Cir Bras**, v. 22, n. 6, p. 457-64, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0102-8650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235934> >.
- AROMANDO, R. F. et al. Angiogenesis in potentially malignant lesions and carcinomas during experimental oral carcinogenesis: a preliminary study in the hamster cheek pouch. **Anticancer Res**, v. 34, n. 11, p. 6381-8, Nov 2014. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368237> >.
- ARRUDA, M. S.; FLEURY, R. N.; NOGUEIRA, M. E. Inoculation of the

Mycobacterium leprae into the hamster cheek pouch. **Lepr Rev**, v. 66, n. 2, p. 181-2, Jun 1995. ISSN 0305-7518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637530> >.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 1, p. 181-9, Jan 2008. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950610> >.

AZAM, F.; MEHTA, S.; HARRIS, A. L. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 8, p. 1323-32, May 2010. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236818> >.

BADRAOUI, R. et al. Walker 256/B malignant breast cancer cells disrupt osteoclast cytomorphometry and activity in rats: modulation by α -tocopherol acetate. **Pathol Res Pract**, v. 210, n. 3, p. 135-41, Mar 2014. ISSN 1618-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314812> >.

_____. Walker 256/B malignant breast cancer cells improve femur angioarchitecture and disrupt hematological parameters in a rat model of tumor osteolysis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 4, p. 3663-70, Apr 2014. ISSN 1423-0380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24318993> >.

BAERISWYL, V.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. **Semin Cancer Biol**, v. 19, n. 5, p. 329-37, Oct 2009. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482086> >.

BALUK, P.; HASHIZUME, H.; MCDONALD, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 1, p. 102-11, Feb 2005. ISSN 0959-437X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661540> >.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother Res**, v. 15, n. 7, p. 561-71, Nov 2001. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11746834> >.

BARBOSA BEZERRA, G. et al. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. **Biomed Pharmacother**, v. 85, p. 687-696, Jan 2017. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27955827> >.

BARBOSA, R. A. et al. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. **Pharm Biol**, v. 54, n. 6, p. 993-1004, 2016. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26511070> >.

BARKER, C. F.; BILLINGHAM, R. E. The lymphatic status of hamster cheek pouch tissue in relation to its properties as a graft and as a graft site. **J Exp Med**, v. 133, n. 3, p. 620-39, Mar 1971. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4106806> >.

BEGNINI, K. R. et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, p. 639856, 2014. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530785> >.

BENKOVIĆ, V. et al. Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 1, p. 167-72, Jan 2008. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175964> >.

BENTLEY, K.; CHAKRAVARTULA, S. The temporal basis of angiogenesis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 372, n. 1720, May 2017. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28348255> >.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-10, Jun 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778130> >.

BERGERS, G.; HANAHAN, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 592-603, Aug 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650835> >.

BERTINATO, J. et al. L-Lysine supplementation does not affect the bioavailability of copper or iron in rats. **J Trace Elem Med Biol**, v. 38, p. 194-200, Dec 2016. ISSN 1878-3252. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968817> >.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S. K.; SHUKLA, S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 8, p. 2703-12, Aug 2008. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18572298> >.

BICZÓ, G. et al. The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 10, p. 2669-81, Nov 2011. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21644850> >.

BIKFALVI, A. History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. **Angiogenesis**, Jul 2017. ISSN 1573-7209. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741165> >.

BISPO JUNIOR, W. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

BORGHETTI, G. et al. Fish oil administration mediates apoptosis of Walker 256 tumor cells by modulation of p53, Bcl-2, caspase-7 and caspase-3 protein expression. **Lipids Health Dis**, v. 14, p. 94, 2015. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26303118> >.

_____. Tumor growth reduction is regulated at the gene level in Walker 256 tumor-

bearing rats supplemented with fish oil rich in EPA and DHA. **Braz J Med Biol Res**, v. 46, n. 8, p. 696-9, Aug 2013. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036940> >.

BOTELHO, N. M. et al. Immunohistochemistry of the uterine cervix of rats bearing the Walker 256 tumor treated with copaiba balsam. **Acta Cir Bras**, v. 28, n. 3, p. 185-9, Mar 2013. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503859> >.

BOUFADI, Y. M. et al. Antioxidant effects and bioavailability evaluation of propolis extract and its content of pure polyphenols. **J Food Biochem**, v.42, n.1, 2017.

BRIDGEMAN, V. L. et al. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models. **J Pathol**, v. 241, n. 3, p. 362-374, Feb 2017. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27859259> >.

BRIGATTE, P. et al. Walker 256 Tumor Growth Suppression by Crotoxin Involves Formyl Peptide Receptors and Lipoxin A4. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 2457532, 2016. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27190493> >.

BRUNO, A. et al. Inflammatory angiogenesis and the tumor microenvironment as targets for cancer therapy and prevention. **Cancer Treat Res**, v. 159, p. 401-26, 2014. ISSN 0927-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114493> >.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 19, p. 4546-50, May 2013. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607483> >.

_____. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144954, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26660901> >.

_____. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling**, v. 29, n. 10, p. 1233-42, 2013. ISSN 1029-2454. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24099330> >.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-57, Sep 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001068> >.

_____. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 6, p. 417-27, Jun 2011. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629292> >.

CHAN, H. S. et al. Improved safety and efficacy of (213)Bi-DOTATATE-targeted

alpha therapy of somatostatin receptor-expressing neuroendocrine tumors in mice pre-treated with L-lysine. **EJNMMI Res**, v. 6, n. 1, p. 83, Dec 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27873240> >.

CHEKHUN, V. F. et al. Metalloproteins during development of Walker-256 carcinosarcoma resistant phenotype. **Ukr Biochem J**, v. 87, n. 2, p. 103-12, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 2409-4943. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26255344> >.

CHEN, X. et al. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced hamster cheek pouch carcinogenesis by a 5-lipoxygenase inhibitor, garcinol. **Nutr Cancer**, v. 64, n. 8, p. 1211-8, 2012. ISSN 1532-7914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137051> >.

CHUKANOVA, E. I.; MAMAEVA, K. I.; CHUKANOVA, A. S. [Treatment of chronic cerebral venous insufficiency: a study on an effect of L-lysine aescinat]. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, v. 116, n. 7, p. 37-41, 2016 2016. ISSN 1997-7298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27500874> >.

CONCEIÇÃO, F. G. et al. Preconditioning of the response to ischemia/ reperfusion-induced plasma leakage in hamster cheek pouch microcirculation. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 8, p. 923-9, Aug 2012. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22948461> >.

CORRÊA, F. R. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomed Pharmacother**, v. 86, p. 162-171, Feb 2017. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27978495> >.

CRUYS, B. et al. Glycolytic regulation of cell rearrangement in angiogenesis. **Nat Commun**, v. 7, p. 12240, Jul 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27436424> >.

CRUZ, B.; GOMES-MARCONDES, M. C. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 2, 2014. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24383706> >.

CRUZ, M. et al. Antioxidant and dual dose-dependent antigenotoxic and genotoxic properties of an ethanol extract of propolis. **RCS Advances**, v. 6, n. 55, p. 49806-49816, 2016.

CZAKÓ, M.; MÁRTON, L. A heartwood pigment in Dalbergia cell cultures. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 1013-22, Jul 2001. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423148> >.

D'YAKONOVA, E. N. et al. [The use of L-lysine aescinat in the treatment of microcirculatory disturbances in patients young and middle age with violation of the intracranial venous outflow]. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, v. 116, n. 9, p. 42-50, 2016. ISSN 1997-7298. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27735898> >.

DA CRUZ ALMEIDA, E. T. et al. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **J Pharm Anal**, v. 7, n. 5, p. 280-287, Oct 2017. ISSN 2095-1779. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29404050> >.

DA CUNHA, M. G. et al. Apolar Bioactive Fraction of *Melipona scutellaris* Geopropolis on *Streptococcus mutans* Biofilm. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 256287, 2013. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843868> >.

DA SILVA, A. M. et al. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model of toxocaríasis: histopathological, immunohistochemical, and immunoelectron microscopic findings. **Parasitol Res**, v. 114, n. 3, p. 809-21, Mar 2015. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25518818> >.

DA SILVA, R. O. et al. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 170, p. 66-71, Jul 2015. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25978955> >.

DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 175135, 2013. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23662115> >.

DALEPRANE, J. B. et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 6, p. 557-66, Jun 2012. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764281> >.

_____. Suppression of hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. **J Nutr**, v. 142, n. 3, p. 441-7, Mar 2012. ISSN 1541-6100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279137> >.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 4, p. 435-41, Dec 2008. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955226> >.

DE FATIMA SILVA, F. et al. Pioglitazone improves insulin sensitivity and reduces weight loss in Walker-256 tumor-bearing rats. **Life Sci**, v. 171, p. 68-74, Feb 2017. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28034669> >.

DE LIMA, R. O. et al. Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. **Environ Mol Mutagen**, v. 45, n. 1, p. 8-16, 2005. ISSN 0893-6692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15605358> >.

DE MENDONÇA, I. C. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 357, 2015. ISSN 1472-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26467757> >.

DE QUEIROZ, E. A. et al. Metformin reduces the Walker-256 tumor development in obese-MSG rats via AMPK and FOXO3a. **Life Sci**, v. 121, p. 78-87, Jan 2015. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497710> >.

DE SOUZA, C. O. et al. Effects of celecoxib and ibuprofen on metabolic disorders induced by Walker-256 tumor in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 399, n. 1-2, p. 237-46, Jan 2015. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359170> >.

_____. Celecoxib and Ibuprofen Restore the ATP Content and the Gluconeogenesis Activity in the Liver of Walker-256 Tumor-Bearing Rats. **Cell Physiol Biochem**, v. 36, n. 4, p. 1659-69, 2015. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160389> >.

DEMINICE, R. et al. Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. **Amino Acids**, Jan 2016. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781304> >.

_____. Resistance exercise prevents impaired homocysteine metabolism and hepatic redox capacity in Walker-256 tumor-bearing male Wistar rats. **Nutrition**, Mar 2016. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27288195> >.

DEWHIRST, M. W. Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. **Radiat Res**, v. 172, n. 6, p. 653-65, Dec 2009. ISSN 1938-5404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929412> >.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Res Lett**, v. 11, n. 1, p. 301, Dec 2016. ISSN 1931-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27316742> >.

DORNELAS, C. A. et al. [Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder]. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 0102-8650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491221> >.

_____. Potential chemoprotective effects of green propolis, L-lysine and celecoxib on bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of Wistar rats subjected to bladder chemical carcinogenesis. **Acta Cir Bras**, v. 29, n. 7, p. 423-8, Jul 2014. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054872> >.

_____. Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. **Acta Cir Bras**, v. 27, n. 8, p. 529-36, Aug 2012.

ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850703> >.

_____. Chemoprevention with green propolis green propolis extracted in L-lysine versus carcinogenesis promotion with L-lysine in N-Butyl-N-[4-hydroxybutyl] nitrosamine (BBN) induced rat bladder cancer. **Acta Cir Bras**, v. 27, n. 2, p. 185-92, Feb 2012. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378376> >.

_____. Bladder carcinogenesis in rats subjected to ureterosigmoidostomy and treated with L-lysine. **Rev Col Bras Cir**, v. 43, n. 2, p. 80-6, 2016 Mar-Apr 2016. ISSN 1809-4546. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27275588> >.

DUFOUR, F. D. et al. Chemotherapy against human melanoma in the hamster cheek pouch. **J Surg Oncol**, v. 15, n. 4, p. 355-61, 1980. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7453185> >.

EBOS, J. M.; LEE, C. R.; KERBEL, R. S. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 16, p. 5020-5, Aug 2009. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671869> >.

EFREMOV, A. V. et al. Changes in lipid metabolism during Walker 256 tumor growth and the therapeutic effect of hyperthermia. **Bull Exp Biol Med**, v. 156, n. 6, p. 838-40, Apr 2014. ISSN 1573-8221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24824711> >.

EGGELING, L.; BOTT, M. A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 8, p. 3387-94, Apr 2015. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25761623> >.

ELLIS, L. M.; REARDON, D. A. Cancer: The nuances of therapy. **Nature**, v. 458, n. 7236, p. 290-2, Mar 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19295595> >.

EARLE, W. R. A study of the walker rat mammary carcinoma 256, *in vivo* and *in vitro*. **Am J Cancer**. v.8, p. 566-612, 1935.

FAN, H. et al. Comparative Pharmacokinetics of Ginsenoside Rg3 and Ginsenoside Rh2 after Oral Administration of Ginsenoside Rg3 in Normal and Walker 256 Tumor-bearing Rats. **Pharmacogn Mag**, v. 12, n. 45, p. 21-4, 2016 Jan-Mar 2016. ISSN 0973-1296. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27019557> >.

FASOLO, D. et al. Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology-based product and porcine skin and mucosa: Analytical and bioanalytical assays. **J Pharm Biomed Anal**, v. 124, p. 57-66, May 2016. ISSN 1873-264X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26930582> >.

FECHINE-JAMACARU, F. V. **In vivo quantification of corneal angiogenesis using digital image processing**. 2006. (Doutorado). Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

_____. **Desenvolvimento e validação de um método para análise morfométrica e fractal da rede vascular peritumoral em modelos experimentais de câncer**. 2018. (Mestrado profissional). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FENNER, F. L. et al. Increased nitric oxide levels in cerebellum of cachectic rats with Walker 256 solid tumor. **Folia Neuropathol**, v. 53, n. 2, p. 139-46, 2015. ISSN 1509-572X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216116> >.

FERLAND-MCCOLLOUGH, D. et al. Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology. **Pharmacol Ther**, v. 171, p. 30-42, Mar 2017. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27916653> >.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 6, p. 789-91, Jun 2009. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164810> >.

FERRARA, N.; ADAMIS, A. P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 6, p. 385-403, 06 2016. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775688> >.

FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 967-74, Dec 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355214> >.

FOLKMAN, J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. **N Engl J Med**, v. 333, n. 26, p. 1757-63, Dec 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7491141> >.

_____. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Semin Oncol**, v. 29, n. 6 Suppl 16, p. 15-8, Dec 2002. ISSN 0093-7754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516034> >.

_____. Angiogenesis. **Annu Rev Med**, v. 57, p. 1-18, 2006. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409133> >.

_____. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 4, p. 273-86, Apr 2007. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396134> >.

FOLKMAN, J.; KALLURI, R. Cancer without disease. **Nature**, v. 427, n. 6977, p. 787, Feb 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985739> >.

FOX, R. J.; FRAME, M. D. Regulation of flow and wall shear stress in arteriolar networks of the hamster cheek pouch. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 5, p. 2080-8,

May 2002. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11960960> >.

FRACARO, L. et al. Walker 256 tumor-bearing rats demonstrate altered interstitial cells of Cajal. Effects on ICC in the Walker 256 tumor model. **Neurogastroenterol Motil**, v. 28, n. 1, p. 101-15, Jan 2016. ISSN 1365-2982. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26526599> >.

FRANCO, C. C. et al. Protective effect of metformin against walker 256 tumor growth is not dependent on metabolism improvement. **Cell Physiol Biochem**, v. 34, n. 6, p. 1920-32, 2014. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500480> >.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **Eur J Med Chem**, v. 110, p. 267-79, Mar 2016. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26840367> >.

FREITAS, A. S. et al. Palynological analysis of Brazilian propolis samples. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, Dallas, v. 3, n. 2, p. 67-74, 2011

FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol**, v. 52, p. 137-42, Feb 2013. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23174518> >.

_____. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 63, p. 195-204, Jan 2014. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24239894> >.

FROZZA, C. O. S. et al. LC-MS analysis of Hep-2 and Hek-293 cell lines treated with Brazilian red propolis reveals differences in protein expression. **J Pharm Pharmacol**, v. 68, n. 8, p. 1073-84, Aug 2016. ISSN 2042-7158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283471> >.

FROZZA, C. O. D. S. et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. **Biomed Pharmacother**, v. 91, p. 951-963, Jul 2017. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28514834> >.

GARCIA, B.H. avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis verde e vermelha contra bactérias cariogênicas. **V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**, 2010. ISBN 978-85-61091-69-9

GAO, W. et al. Effect of microbubble-enhanced ultrasound on percutaneous ethanol ablation of rat walker-256 tumour. **Eur Radiol**, Dec 2015. ISSN 1432-1084. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26676561> >.

GOLDENBERG, D. M. Reduced lymphatic drainage from hamster cheek pouch: a proposed explanation of its immunologically privileged character. **Experientia**, v. 26,

n. 8, p. 907-8, Aug 1970. ISSN 0014-4754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5452035> >.

GOLDENBERG, D. M.; STEINBORN, W. Reduced lymphatic drainage from hamster cheek pouch. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 135, n. 3, p. 724-6, Dec 1970. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5486706> >.

GOMES-NETO, A.; PESSOA, B. B. G. P.; AGUIAR, A.S.; FURTADO, B. M.; MORAES, M. O.; RIBEIRO, R. A. Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker. **Acta Cir Bras**. v. 17, n. 1, p. 12-22, 2002.

HALL, A. P. The role of angiogenesis in cancer. **Comparative Clinical Pathology**, v.13, p. 95-99, Jan. 2005.

HAGENDOORN, J. et al. Onset of abnormal blood and lymphatic vessel function and interstitial hypertension in early stages of carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 66, n. 7, p. 3360-4, Apr 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585153> >.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353-64, Aug 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HEAD, J. R.; BILLINGHAM, R. E. Immunologically privileged sites in transplantation immunology and oncology. **Perspect Biol Med**, v. 29, n. 1, p. 115-31, 1985. ISSN 0031-5982. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3906552> >.

HIDA, K. et al. Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells. **Int J Clin Oncol**, v. 21, n. 2, p. 206-212, Apr 2016. ISSN 1437-7772. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26879652> >.

HOCHMAN, B; FERREIRA, L. M.; BÔAS, F. C. V.; MARIANO, M. Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 415-430, 2003.

HOCHMAN, B. et al. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch, Brazil. **Acta Cir Bras**, v. 20, n. 3, p. 200-12, 2005 May-Jun 2005. ISSN 0102-8650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033178> >.

HU, W.; XIAO, Z. Formononetin induces apoptosis of human osteosarcoma cell line U2OS by regulating the expression of Bcl-2, Bax and MiR-375 in vitro and in vivo. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, n. 3, p. 933-9, 2015. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26381132> >.

HUANG, G. et al. Hypoxia induced CCL28 promotes angiogenesis in lung adenocarcinoma by targeting CCR3 on endothelial cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 27152, Jun

2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250766> >.

IIO, A. et al. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 974-9, Oct 2010. ISSN 1618-095X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382515> >.

_____. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 383-8, Mar 2012. ISSN 1618-095X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305277> >.

INUI, S. et al. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Nat Prod Res**, v. 28, n. 16, p. 1293-6, 2014. ISSN 1478-6427. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666260> >.

IZUTA, H. et al. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 9, p. 45, Nov 2009. ISSN 1472-6882. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917137> >.

JAFARNEJAD, A. et al. The improvement effect of L-Lys as a chemical chaperone on STZ-induced diabetic rats, protein structure and function. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, n. 1, p. 64-73, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1520-7552. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17879961> >.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 685-93, Jun 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778167> >.

_____. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. **Cancer Cell**, v. 26, n. 5, p. 605-22, Nov 2014. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25517747> >.

KAMIYA, T. et al. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 44, p. 11065-70, Nov 2012. ISSN 1520-5118. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066995> >.

KAVITHA, K. et al. Cytomodulin-1, a synthetic peptide abrogates oncogenic signaling pathways to impede invasion and angiogenesis in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. **Biochimie**, v. 102, p. 56-67, Jul 2014. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582832> >.

KAZEROUNIAN, S.; YEE, K. O.; LAWLER, J. Thrombospondins in cancer. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 5, p. 700-12, Mar 2008. ISSN 1420-682X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193162> >.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371345> >.

KHEGAY, I. I.; IVANOVA, L. N. Regression of Walker 256 carcinosarcoma in vasopressin-deficient Brattleboro rats is accompanied by a changed laminin pattern. **Biochem Genet**, v. 53, n. 1-3, p. 1-7, Apr 2015. ISSN 1573-4927. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25854851> >.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. **Annu Rev Physiol**, v. 53, p. 217-39, 1991. ISSN 0066-4278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710435> >.

KOFFAS, M.; STEPHANOPOULOS, G. Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology. **Curr Opin Biotechnol**, v. 16, n. 3, p. 361-6, Jun 2005. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961038> >.

L-lysine. Monograph. **Altern Med Rev**, v. 12, n. 2, p. 169-72, Jun 2007. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604462> >.

LEMOS, T. L. G. et al. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, 2018.

LENZI, P.; BOCCI, G.; NATALE, G. John Hunter and the origin of the term "angiogenesis". **Angiogenesis**, v. 19, n. 2, p. 255-6, Apr 2016. ISSN 1573-7209. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26842740> >.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 10, p. 5434-40, May 2008. ISSN 1464-3391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440233> >.

LIAO, S. F.; WANG, T.; REGMI, N. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. **Springerplus**, v. 4, p. 147, 2015. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25830085> >.

LIMA CAVENDISH, R. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **J Ethnopharmacol**, v. 173, p. 127-33, Sep 2015. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26192808> >.

LINGEN, M. W. et al. The angiogenic switch in hamster buccal pouch keratinocytes is dependent on TGFbeta-1 and is unaffected by ras activation. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 2, p. 329-38, Feb 1997. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054625> >.

LIU, N. et al. Vascular endothelial growth factor accelerates establishment of a model of hepatic metastasis in Walker-256 tumor-bearing rats. **Am J Med Sci**, v. 349, n. 3, p. 234-9, Mar 2015. ISSN 1538-2990. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310512> >.

LOTTI, C. et al. Chemical constituents of red Mexican propolis. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 4, p. 2209-13, Feb 2010. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20121106> >.

LOW, K. P. et al. Novel delivery of Chlorin e6 using anti-EGFR antibody tagged virosomes for fluorescence diagnosis of oral cancer in a hamster cheek pouch model. **Eur J Pharm Sci**, v. 83, p. 143-54, Feb 2016. ISSN 1879-0720. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709081> >.

LÓPEZ, B. G. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chem**, v. 146, p. 174-80, Mar 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176329> >.

MAC GABHANN, F.; POPEL, A. S. Systems biology of vascular endothelial growth factors. **Microcirculation**, v. 15, n. 8, p. 715-38, Nov 2008. ISSN 1549-8719. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18608994> >.

MARCUCCI, M. C. Própolis Tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto Apícola. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 1, n. 3, 2006.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, v. 74, n. 2, p. 105-12, Feb 2001. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167028> >.

MARTINS, G. G. et al. Sesquiterpene lactones of *Moquiniastrum polymorphum* subsp. *floccosum* have antineoplastic effects in Walker-256 tumor-bearing rats. **Chem Biol Interact**, v. 228, p. 46-56, Feb 2015. ISSN 1872-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25616030> >.

McBEATH, M.; PAULING, L. A case history: lysine/ascorbate-related amelioration of angina pectoris. **J Orthom Med**, v. 8, n. 2, 1993.

MEDIĆ-SARIĆ, M. et al. From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. **Nutr J**, v. 8, p. 33, Jul 2009. ISSN 1475-2891. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19624827> >.

MENEGHELLI, C. et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an in vitro and in vivo study. **Microvasc Res**, v. 88, p. 1-11, Jul 2013. ISSN 1095-9319. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538317> >.

MESSERLI, S. M. et al. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. **Phytother Res**, v. 23, n. 3, p. 423-7, Mar 2009. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003952> >.

MIRMIRANPOUR, H. et al. Investigation of the mechanism(s) involved in decreasing increased fibrinogen activity in hyperglycemic conditions using L-lysine supplementation. **Thromb Res**, v. 130, n. 3, p. e13-9, Sep 2012. ISSN 1879-2472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575419> >.

_____. The Preventive Effect of L-Lysine on Lysozyme Glycation in Type 2 Diabetes. **Acta Med Iran**, v. 54, n. 1, p. 24-31, Jan 2016. ISSN 1735-9694. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853287> >.

MONTI-HUGHES, A. et al. The hamster cheek pouch model for field cancerization studies. **Periodontol 2000**, v. 67, n. 1, p. 292-311, Feb 2015. ISSN 1600-0757. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494606> >.

MORANO, J. A. C. O. D. **Avaliação dos efeitos da hipertermoterapia por ultrassom associada a agentes antiangiogênicos no tratamento do tumor experimental de Walker**. 2009. (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MORSY, A. S. et al. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. **Trop Anim Health Prod**, v. 45, n. 7, p. 1609-18, Oct 2013. ISSN 1573-7438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558377> >.

_____. Impact of Brazilian red propolis extract on blood metabolites, milk production, and lamb performance of Santa Inês ewes. **Trop Anim Health Prod**, v. 48, n. 5, p. 1043-50, Jun 2016. ISSN 1573-7438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27098314> >.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618-31, Aug 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633355> >.

MURPHY, P. A. et al. Notch4 normalization reduces blood vessel size in arteriovenous malformations. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 117, p. 117ra8, Jan 2012. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261032> >.

NAGINI, S. et al. Chlorophyllin abrogates canonical Wnt/ β -catenin signaling and angiogenesis to inhibit the development of DMBA-induced hamster cheek pouch carcinomas. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 35, n. 5, p. 385-95, Oct 2012. ISSN 2211-3436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983718> >.

NAGY, J. A. et al. Heterogeneity of the tumor vasculature. **Semin Thromb Hemost**, v. 36, n. 3, p. 321-31, Apr 2010. ISSN 1098-9064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490982> >.

NAKAJIMA, Y. et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sci**, v. 80, n. 4, p. 370-7, Jan 2007. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046025> >.

- _____. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. **Phytother Res**, v. 23, n. 10, p. 1431-8, Oct 2009. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277960> >.
- NANI, B. D. et al. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. **Phytother Res**, Jan 2018. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29377427> >.
- NIGRO, E. et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 658913, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110685> >.
- NORDEN, A. D.; DRAPPATZ, J.; WEN, P. Y. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. **Nat Rev Neurol**, v. 5, n. 11, p. 610-20, Nov 2009. ISSN 1759-4766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826401> >.
- NOVAK, E. M. et al. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 91-102, 2014/11/01/ 2014. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614002928> >.
- NYBERG, P.; XIE, L.; KALLURI, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. **Cancer Res**, v. 65, n. 10, p. 3967-79, May 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899784> >.
- OAK, M. H.; EL BEDOUI, J.; SCHINI-KERTH, V. B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **J Nutr Biochem**, v. 16, n. 1, p. 1-8, Jan 2005. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629234> >.
- OLIVE, K. P. et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. **Science**, v. 324, n. 5933, p. 1457-61, Jun 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460966> >.
- OLIVEIRA, P. F. M. et al. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. **Acta Cir Bras**, v. 13, n. 4, p. 243-248, 1998.
- ORŠOLIĆ, N. et al. Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan. **Med Oncol**, v. 27, n. 4, p. 1346-58, Dec 2010. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013318> >.
- PADERA, T. P. et al. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. **Nature**, v. 427, n. 6976, p. 695, Feb 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973470> >.

PANDE, P. et al. Automated analysis of multimodal fluorescence lifetime imaging and optical coherence tomography data for the diagnosis of oral cancer in the hamster cheek pouch model. **Biomed Opt Express**, v. 7, n. 5, p. 2000-15, May 2016. ISSN 2156-7085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27231638> >.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 282, n. 5, p. C947-70, May 2002. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940508> >.

PARK, S. I. et al. Korean propolis suppresses angiogenesis through inhibition of tube formation and endothelial cell proliferation. **Nat Prod Commun**, v. 9, n. 4, p. 555-60, Apr 2014. ISSN 1934-578X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24868883> >.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 9, p. 2502-6, Apr 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958612> >.

PASQUALE, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 3, p. 165-80, Mar 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179713> >.

PAULING, L. Third case report on lysine-ascorbate amelioration of angina pectoris. **J Orthom Med**, v. 8, n. 3, p. 137-138, 1993.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 12, p. 6484-91, Jun 2011. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21598949> >.

PIGATTO, M. C. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of etoposide tumor growth inhibitory effect in Walker-256 tumor-bearing rat model using free intratumoral drug concentrations. **Eur J Pharm Sci**, v. 97, p. 70-78, Jan 2017. ISSN 1879-0720. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816627> >.

PINHEIRO, K. S. et al. Modulatory activity of Brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. **Acta Cir Bras**, v. 29, n. 2, p. 111-7, Feb 2014. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24604315> >.

PIPPI, B. et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **J Appl Microbiol**, v. 118, n. 4, p. 839-50, Apr 2015. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25565139> >.

POTENTE, M.; CARMELIET, P. The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. **Annu Rev Physiol**, v. 79, p. 43-66, Feb 2017. ISSN 1545-1585.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27992732> >.

PRATHEESHKUMAR, P. et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47516, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094058> >.

_____. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52279, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300633> >.

PRIYADARSINI, R. V. et al. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. **Free Radic Res**, v. 43, n. 5, p. 492-504, May 2009. ISSN 1029-2470. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19391054> >.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, Apr 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371344> >.

RAICA, M.; CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **Eur J Cancer**, v. 45, n. 11, p. 1924-34, Jul 2009. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406633> >.

RASHIDI, B. et al. Green tea and its anti-angiogenesis effects. **Biomed Pharmacother**, v. 89, p. 949-956, May 2017. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28292023> >.

RAUD, J. et al. Prostaglandin E2 prevents diclofenac-induced enhancement of histamine release and inflammation evoked by in vivo challenge with compound 48/80 in the hamster cheek pouch. **Agents Actions**, v. 28, n. 1-2, p. 108-14, Aug 1989. ISSN 0065-4299. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476919> >.

RAVISHANKAR, D. et al. Exploring quercetin and luteolin derivatives as antiangiogenic agents. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 259-74, Jun 2015. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25984842> >.

RAZA, A.; FRANKLIN, M. J.; DUDEK, A. Z. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. **Am J Hematol**, v. 85, n. 8, p. 593-8, Aug 2010. ISSN 1096-8652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20540157> >.

REGUEIRA, M. S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food Chem Toxicol**, v. 107, n. Pt B, p. 572-580, Sep 2017. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28359875> >.

RIBATTI, D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. **Leuk Res**, v. 33, n. 5, p. 638-44, May 2009. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19117606> >.

RIBATTI, D.; NICO, B.; CRIVELLATO, E. The role of pericytes in angiogenesis. **Int J Dev Biol**, v. 55, n. 3, p. 261-8, 2011. ISSN 1696-3547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710434> >.

RIBEIRO, D. R. et al. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 117, n. 2, p. 85-95, Aug 2015. ISSN 1742-7843. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25556639> >.

RIBEIRO, J. C. et al. Potential inhibitory effect of LASSBio-596, a new thalidomide hybrid, on inflammatory corneal angiogenesis in rabbits. **Ophthalmic Res**, v. 48, n. 4, p. 177-85, 2012. ISSN 1423-0259. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22777402> >.

RIDGWAY, J. et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1083-7, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183323> >.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J Sci Food Agric**, v. 91, n. 13, p. 2363-70, Oct 2011. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21590778> >.

ROOMI, M. W. et al. A nutrient mixture inhibits glioblastoma xenograft U-87 MG growth in male nude mice. **Exp Oncol**, v. 38, n. 1, p. 54-6, Mar 2016. ISSN 1812-9269. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27031721> >.

_____. A Specific Mixture of Nutrients Suppresses Ovarian Cancer A-2780 Tumor Incidence, Growth, and Metastasis to Lungs. **Nutrients**, v. 9, n. 3, Mar 2017. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28335466> >.

RUOSLAHTI, E.; BHATIA, S. N.; SAILOR, M. J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. **J Cell Biol**, v. 188, n. 6, p. 759-68, Mar 2010. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231381> >.

SAGAR, S. M.; YANCE, D.; WONG, R. K. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1. **Curr Oncol**, v. 13, n. 1, p. 14-26, Feb 2006. ISSN 1198-0052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576437> >.

SANTOS, A. M. et al. Carcinogenesis in rats subjected to a new model ureterosigmoidostomy and treated with L-lysine. **Acta Cir Bras**, v. 31, n. 12, p. 793-800, Dec 2016. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28076502> >.

SANTOS, A. M. D. et al. Transitional metaplasia in intestinal epithelium of rats submitted to intestinal cystoplasty and treatment with L -lysine. **Acta Cir Bras**, v. 32,

n. 4, p. 297-306, Apr 2017. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538804> >.

SATO, T.; ITO, Y.; NAGASAWA, T. L-Lysine suppresses myofibrillar protein degradation and autophagy in skeletal muscles of senescence-accelerated mouse prone 8. **Biogerontology**, v. 18, n. 1, p. 85-95, Feb 2017. ISSN 1573-6768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27752791> >.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 676, 06/28/online 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019> >.

SCHMIDT, E. M. et al. A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 257617, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530958> >.

SEBRAE. **Origem Garantida. Empreendedor**. 323: 1-3 p. 2012.

SENA-LOPES, Â. et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0191797, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29390009> >.

SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytother Res**, v. 30, n. 6, p. 894-905, Jun 2016. ISSN 1099-1573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26988443> >.

SHIMOMURA, A. et al. Dietary L-lysine prevents arterial calcification in adenine-induced uremic rats. **J Am Soc Nephrol**, v. 25, n. 9, p. 1954-65, Sep 2014. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24652795> >.

SHUKLA, S.; BHADAURIA, M.; JADON, A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Indian J Exp Biol**, v. 42, n. 10, p. 993-7, Oct 2004. ISSN 0019-5189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15511003> >.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 3, p. 313-6, Sep 2008. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18830449> >.

SILVA, J. F. et al. Vimentin and laminin are altered on cheek pouch microvessels of streptozotocin-induced diabetic hamsters. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 11, p. 1961-8, 2011. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22086529> >.

SILVA, L. F. G. et al. Modelo de tumor experimental em rim de ratos. **Acta Cir Bras**, v. 17, n. 1, p. 62-66, 2002.

SILVA, M. O.; LIBERATO, T. C. Caracterização química da própolis vermelha produzida no estado do Ceará. **53º Congresso Brasileiro de Química**. Natal, RN. 2014.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 206439, 2015. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106433> >.

SILVA-CARVALHO, R. et al. Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. **J Fun Food**, v. 11, p. 160–171, 2014

SILVAN, S.; MANOHARAN, S. Apigenin prevents deregulation in the expression pattern of cell-proliferative, apoptotic, inflammatory and angiogenic markers during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Arch Oral Biol**, v. 58, n. 1, p. 94-101, Jan 2013. ISSN 1879-1506. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776109> >.

SINGH, M. et al. Medicinal Uses of L-Lysine: Past and Future. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 637-642, 2011.

SINHORINI, I. L.; MERUSSE, J. L.; MARIANO, M. Role of lymphatic drainage on the development of Calmette-Guérin bacillus-induced granulomas in the hamster. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 103, n. 2, p. 166-74, 1994. ISSN 1018-2438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8292904> >.

SMITH, G. M. A comparison of the effects of cytotoxic agents on the Walker 256 tumour growing in the rat and at the hamster cheek pouch. **Br J Cancer**, v. 23, n. 1, p. 88-94, Mar 1969a. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5768448> >.

_____. The effect of cytotoxic agents on human tumours transplanted to the hamster cheek pouch. **Br J Cancer**, v. 23, n. 1, p. 78-87, Mar 1969b. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5768447> >.

STEPHENSON, J. A. et al. Tumour Angiogenesis: A Growth Area—From John Hunter to Judah Folkman and Beyond. **J Cancer Res**, v.2013, ID 895019, 2013.

STIPP, M. C. et al. Necroptosis mediates the antineoplastic effects of the soluble fraction of polysaccharide from red wine in Walker-256 tumor-bearing rats. **Carbohydr Polym**, v. 160, p. 123-133, Mar 2017. ISSN 1879-1344. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115086> >.

SVENSJÖ, E. et al. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. **Inflamm Res**, v. 52, n. 5, p. 215-20, May 2003. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813626> >.

TELES, F. et al. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116535, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607548> >.

TODOR, I. N. et al. Metabolic changes during development of Walker-256 carcinosarcoma resistance to doxorubicin. **Exp Oncol**, v. 37, n. 1, p. 19-22, Mar 2015. ISSN 1812-9269. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25804226> >.

TRUSHEVA, B. et al. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 683-9, Dec 2004. ISSN 0367-326X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15567244> >.

TURNER, H. E. et al. Angiogenesis in endocrine tumors. **Endocr Rev**, v. 24, n. 5, p. 600-32, Oct 2003. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570746> >.

URSO, K. et al. IL4RA on lymphatic endothelial cells promotes T cell egress during sclerodermatous graft versus host disease. **JCI Insight**, v. 1, n. 12, Aug 2016. ISSN 2379-3708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547823> >.

VERHOEFF, J. J. et al. Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. **BMC Cancer**, v. 9, p. 444, Dec 2009. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015387> >.

WAHEED ROOMI, M. et al. Inhibition of the SK-N-MC human neuroblastoma cell line in vivo and in vitro by a novel nutrient mixture. **Oncol Rep**, v. 29, n. 5, p. 1714-20, May 2013. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446555> >.

WANG, H. et al. Abscopal antitumor immune effects of magnet-mediated hyperthermia at a high therapeutic temperature on Walker-256 carcinosarcomas in rats. **Oncol Lett**, v. 7, n. 3, p. 764-770, Mar 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527084> >.

WANG, K. et al. Molecular mechanisms underlying the in vitro anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from chinese propolis (poplar type). **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 127672, 2013. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401705> >.

WOLF, J. E.; HUBLER, W. R. Tumor angiogenic factor and human skin tumors. **Arch Dermatol**, v. 111, n. 3, p. 321-7, Mar 1975. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1091213> >.

ZAID, K. W. et al. Lack of Effects of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein2 on Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma Induced in the Syrian hamster Cheek Pouch. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 7, p. 3527-31, 2016. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27510004> >.

ZARUR, J. M. et al. Quimioembolização transarterial hepática: modelo experimental de tumor em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 5, p. 511-6, 2004.

ZEE, Y. K. et al. Imaging angiogenesis of genitourinary tumors. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 2, p. 69-82, Feb 2010. ISSN 1759-4820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084077> >.

ZHANG, M. et al. Low-Dose Cannabinoid Type 2 Receptor Agonist Attenuates Tolerance to Repeated Morphine Administration via Regulating μ -Opioid Receptor Expression in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. **Anesth Analg**, v. 122, n. 4, p. 1031-7, Apr 2016. ISSN 1526-7598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26720619> >.

ZHANG, X. et al. Formononetin induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells through enhancing the Bax/Bcl-2 ratios and regulating the p38/Akt pathway. **Nutr Cancer**, v. 66, n. 4, p. 656-61, 2014. ISSN 1532-7914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666255> >.

ZIEGLER, M. M.; BARKER, C. F. Carcinogenesis in immunologically privileged sites. **Fed Proc**, v. 37, n. 7, p. 2057-8, May 1978. ISSN 0014-9446. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/640014> >.

ZIEGLER, M. M.; LOPEZ, V.; BARKER, C. F. Carcinogenesis in an immunologically privileged site. **J Surg Res**, v. 18, n. 2, p. 201-7, Feb 1975. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1094194> >.

ZUMSTEG, A.; CHRISTOFORI, G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. **Curr Opin Oncol**, v. 21, n. 1, p. 60-70, Jan 2009. ISSN 1531-703X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125020> >.

APÊNDICE A – ESTUDO-PILOTO DO INÓCULO TUMORAL

Os inóculos tumorais usados foram de carcinossarcoma de Walker, fornecidos pelo LNOE. O tumor foi mantido por inoculação intramuscular de suspensão de células tumorais, em face medial de coxa de rato, com repicagem a cada sete dias. No 7º dia de inoculação das células do tumor de Walker, os ratos foram mortos com dose aprofundada de anestésico (quetamina e xilazina) para retirada do tumor. O tecido tumoral ressecado foi triturado com tesoura cirúrgica em uma solução de ringer lactado 5ml e gentamicina 0,1ml, sob o gelo. Em seguida, as células tumorais viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com azul de tripan 4%. Finalmente, foi preparada uma suspensão com as células tumorais.

Para o inóculo das células tumorais, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal com mistura de quetamina (100 mg/kg peso) e xilazina (5 mg/kg peso). Em seguida, a bolsa jugal esquerda foi evertida e limpa com soro fisiológico, e, então, foi realizada a inoculação da suspensão de células, subepitelial, no retículo central, com seringa de insulina e agulha hipodérmica. Foi estabelecido fazer o inóculo distante das fibras do músculo retrator da bolsa que se inserem no seu terço proximal, com o intuito de evitar o contato com vasos linfáticos.

No primeiro piloto, três animais, hamsters *Mesocricetus auratus*, foram submetidos ao inóculo tumoral, de concentração 5×10^6 células/ml. Foram inoculados 0,2 ml na bolsa jugal esquerda de cada animal. No 4º dia e no 7º dia após o inóculo, os animais foram anestesiados para verificar a evolução do crescimento tumoral. Dois animais desenvolveram lesões tumorais pequenas. O tumor, na concentração e volume inoculado, não cresceu satisfatoriamente.

No segundo piloto três animais, hamsters *Mesocricetus auratus*, foram submetidos ao inóculo tumoral, de concentração $1,2 \times 10^7$ células/ml. Foi inoculado apenas 0,1 ml na bolsa jugal esquerda de cada animal. Nos dias 6º, 8º 10º e 13º após o inóculo, os animais foram anestesiados para verificar a evolução do crescimento tumoral. Nessa concentração e nesse volume de inóculo, foi verificada uma evolução adequada do crescimento tumoral para o estudo da angiogênese.

APÊNDICE B – TABELA DE EXCLUSÃO

Tabela 7 – Causas de exclusão de animais dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII.

Grupo	Causa Nu. excluído (n)	Nu. excluído (n)
I	-	0
II	3 (11) Sc Tu 2 (11) Tu In	5 (11)
III	-	0
IV	-	0
V	-	0
VI	1 (7) Tu In	1 (7)
VII	-	0
VIII	-	0

Fonte: Próprio autor.

Tu – tumor; Sc Tu – sem crescimento de tumor; Tu In – Tumor Invadiu. Nu – número de animais excluídos; n – número total de animais no grupo.

APÊNDICE C – ÁREA VASCULAR DO IMPLANTE TUMORAL

Tabela 8 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em porcentagem, dos animais do grupo da própolis vermelha (I).

Grupo I	Área selecionada	Área vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	19071,00	22,00
N1 SUP ESQ	86700,00	18436,00	21,26
N1 INF DIR	86700,00	19091,00	22,02
N1 INF ESQ	86700,00	20004,00	23,07
Média	86700,00	19150,50	22,09
N2 SUP DIR	86700,00	20130,00	23,22
N2 SUP ESQ	86700,00	19514,00	22,51
N2 INF DIR	86700,00	20503,00	23,65
N2 INF ESQ	86700,00	16688,00	19,25
Média	86700,00	19208,75	22,16
N3 SUP DIR	86700,00	17713,00	20,43
N3 SUP ESQ	86700,00	19609,00	22,62
N3 INF DIR	86700,00	18773,00	21,65
N3 INF ESQ	86700,00	20197,00	23,30
Média	86700,00	19073,00	22,00
N4 SUP DIR	86700,00	20965,00	24,18
N4 SUP ESQ	86700,00	20186,00	23,28
N4 INF DIR	86700,00	20363,00	23,49
N4 INF ESQ	86700,00	20395,00	23,52
Média	86700,00	20477,25	23,62
N5 SUP DIR	86700,00	20965,00	24,18
N5 SUP ESQ	86700,00	18180,00	20,97
N5 INF DIR	86700,00	21000,00	24,22
N5 INF ESQ	86700,00	20267,00	23,38
Média	86700,00	20103,00	23,19
N6 SUP DIR	86700,00	20361,00	23,48
N6 SUP ESQ	86700,00	20329,00	23,45
N6 INF DIR	86700,00	19915,00	22,97
N6 INF ESQ	86700,00	17716,00	20,43
Média	86700,00	19580,25	22,58
MÉDIA		19598,79	22,61

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

Tabela 9 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em porcentagem, dos animais do grupo da L-lisina (II).

Grupo II	Área selecionada	Área Vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	19219,00	22,17
N1 SUP ESQ	86700,00	19128,00	22,06
N1 INF DIR	86700,00	18816,00	21,70
N1 INF ESQ	86700,00	18895,00	21,79
Média	86700,00	19014,50	21,93
N2 SUP DIR	86700,00	20427,00	23,56
N2 SUP ESQ	86700,00	19820,00	22,86
N2 INF DIR	86700,00	20348,00	23,47
N2 INF ESQ	86700,00	17953,00	20,71
Média	86700,00	19637,00	22,65
N3 SUP DIR	86700,00	18864,00	21,76
N3 SUP ESQ	86700,00	19215,00	22,16
N3 INF DIR	86700,00	19088,00	22,02
N3 INF ESQ	86700,00	18488,00	21,32
Média	86700,00	18913,75	21,82
N4 SUP DIR	86700,00	18832,00	21,72
N4 SUP ESQ	86700,00	18693,00	21,56
N4 INF DIR	86700,00	19047,00	21,97
N4 INF ESQ	86700,00	18942,00	21,85
Média	86700,00	18878,50	21,77
N5 SUP DIR	86700,00	18648,00	21,51
N5 SUP ESQ	86700,00	18732,00	21,61
N5 INF DIR	86700,00	19515,00	22,51
N5 INF ESQ	86700,00	19509,00	22,50
Média	86700,00	19101,00	22,03
N6 SUP DIR	86700,00	19602,00	22,61
N6 SUP ESQ	86700,00	19737,00	22,76
N6 INF DIR	86700,00	19728,00	22,75
N6 INF ESQ	86700,00	19674,00	22,69
Média	86700,00	19685,25	22,71
MÉDIA		19205,00	22,15

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

Tabela 10 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em porcentagem, dos animais do grupo da goma arábica (III).

Grupo III	Área selecionada	Área Vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	19708,00	22,73
N1 SUP ESQ	86700,00	18829,00	21,72
N1 INF DIR	86700,00	20901,00	24,11
N1 INF ESQ	86700,00	19198,00	22,14
Média	86700,00	19659,00	22,67
N2 SUP DIR	86700,00	19796,00	22,83
N2 SUP ESQ	86700,00	19255,00	22,21
N2 INF DIR	86700,00	20840,00	24,04
N2 INF ESQ	86700,00	19653,00	22,67
Média	86700,00	19886,00	22,94
N3 SUP DIR	86700,00	19742,00	22,77
N3 SUP ESQ	86700,00	20357,00	23,48
N3 INF DIR	86700,00	20840,00	24,04
N3 INF ESQ	86700,00	19691,00	22,71
Média	86700,00	20157,50	23,25
N4 SUP DIR	86700,00	19705,00	22,73
N4 SUP ESQ	86700,00	19117,00	22,05
N4 INF DIR	86700,00	18028,00	20,79
N4 INF ESQ	86700,00	19288,00	22,25
Média	86700,00	19034,50	21,95
N5 SUP DIR	86700,00	20239,00	23,34
N5 SUP ESQ	86700,00	19889,00	22,94
N5 INF DIR	86700,00	20085,00	23,17
N5 INF ESQ	86700,00	20786,00	23,97
Média	86700,00	20249,75	23,36
N6 SUP DIR	86700,00	19580,00	22,58
N6 SUP ESQ	86700,00	20507,00	23,65
N6 INF ESQ	86700,00	20458,00	23,60
Média	86700,00	20181,67	23,28
MÉDIA		19861,40	22,91

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

Tabela 11 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em percentagem, dos animais do grupo da água (IV).

Grupo IV	Área selecionada	Área Vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	20625,00	23,79
N1 SUP ESQ	86700,00	20894,00	24,10
N1 INF DIR	86700,00	19986,00	23,05
N1 INF ESQ	86700,00	20944,00	24,16
Média	86700,00	20612,25	23,77
N2 SUP DIR	86700,00	19718,00	22,74
N2 SUP ESQ	86700,00	19968,00	23,03
N2 INF DIR	86700,00	20591,00	23,75
N2 INF ESQ	86700,00	19851,00	22,90
Média	86700,00	20032,00	23,10
N3 SUP ESQ	86700,00	20553,00	23,71
N3 INF DIR	86700,00	19720,00	22,75
N3 INF ESQ	86700,00	21494,00	24,79
Média	86700,00	20589,00	23,75
N4 SUP DIR	86700,00	19929,00	22,99
N4 SUP ESQ	86700,00	21034,00	24,26
N4 INF DIR	86700,00	19672,00	22,69
N4 INF ESQ	86700,00	20643,00	23,81
Média	86700,00	20319,50	23,44
N5 SUP DIR	86700,00	20394,00	23,52
N5 SUP ESQ	86700,00	20581,00	23,74
N5 INF DIR	86700,00	19559,00	22,56
N5 INF ESQ	86700,00	19735,00	22,76
Média	86700,00	20067,25	23,15
N6 SUP DIR	86700,00	20868,00	24,07
N6 SUP ESQ	86700,00	20246,00	23,35
N6 INF DIR	86700,00	20414,00	23,55
N6 INF ESQ	86700,00	20454,00	23,59
Média	86700,00	20495,50	23,64
MÉDIA		20352,58	23,47

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

Tabela 12 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em porcentagem, dos animais do grupo da própolis vermelha (V).

Grupo V	Área selecionada	Área Vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	19251,00	22,20
N1 SUP ESQ	86700,00	19961,00	23,02
N1 INF DIR	86700,00	18095,00	20,87
N1 INF ESQ	86700,00	19133,00	22,07
Média	86700,00	19110,00	22,04
N2 SUP DIR	86700,00	20638,00	23,80
N2 SUP ESQ	86700,00	19668,00	22,69
N2 INF DIR	86700,00	19615,00	22,62
N2 INF ESQ	86700,00	19785,00	22,82
Média	86700,00	19926,50	22,98
N3 SUP DIR	86700,00	21057,00	24,29
N3 SUP ESQ	86700,00	19385,00	22,36
N3 INF DIR	86700,00	19460,00	22,45
N3 INF ESQ	86700,00	17740,00	20,46
Média	86700,00	19410,50	22,39
N4 SUP DIR	86700,00	18917,00	21,82
N4 SUP ESQ	86700,00	20053,00	23,13
N4 INF DIR	86700,00	18886,00	21,78
N4 INF ESQ	86700,00	19062,00	21,99
Média	86700,00	19229,50	22,18
N5 SUP DIR	86700,00	20002,00	23,07
N5 SUP ESQ	86700,00	19610,00	22,62
N5 INF DIR	86700,00	19331,00	22,30
N5 INF ESQ	86700,00	19150,00	22,09
Média	86700,00	19523,25	22,52
N6 SUP DIR	86700,00	19806,00	22,84
N6 SUP ESQ	86700,00	19025,00	21,94
N6 INF DIR	86700,00	19526,00	22,52
N6 INF ESQ	86700,00	19776,00	22,81
Média	86700,00	19533,25	22,53
N7 SUP DIR	86700,00	20255,00	23,36
N7 SUP ESQ	86700,00	19550,00	22,55
N7 INF DIR	86700,00	20203,00	23,30
N7 INF ESQ	86700,00	21306,00	24,57
Média	86700,00	20328,50	23,45
MÉDIA		19580,21	22,58

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

Tabela 13 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em porcentagem, dos animais do grupo da L-lisina (VI).

Grupo VI	Área selecionada	Área Vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	19538,00	22,54
N1 SUP ESQ	86700,00	19175,00	22,12
N1 INF DIR	86700,00	18845,00	21,74
N1 INF ESQ	86700,00	19237,00	22,19
Média	86700,00	19198,75	22,14
N2 SUP DIR	86700,00	19143,00	22,08
N2 SUP ESQ	86700,00	19961,00	23,02
N2 INF DIR	86700,00	19957,00	23,02
N2 INF ESQ	86700,00	19620,00	22,63
Média	86700,00	19670,25	22,69
N3 SUP DIR	86700,00	18482,00	21,32
N3 SUP ESQ	86700,00	20044,00	23,12
N3 INF DIR	86700,00	18903,00	21,80
N3 INF ESQ	86700,00	20013,00	23,08
Média	86700,00	19360,50	22,33
N4 SUP DIR	86700,00	19376,00	22,35
N4 SUP ESQ	86700,00	19752,00	22,78
N4 INF DIR	86700,00	19807,00	22,85
N4 INF ESQ	86700,00	20201,00	23,30
Média	86700,00	19784,00	22,82
N5 SUP DIR	86700,00	19651,00	22,67
N5 SUP ESQ	86700,00	19372,00	22,34
N5 INF DIR	86700,00	19156,00	22,09
N5 INF ESQ	86700,00	19043,00	21,96
Média	86700,00	19305,50	22,27
N6 SUP DIR	86700,00	20056,00	23,13
N6 SUP ESQ	86700,00	19934,00	22,99
N6 INF DIR	86700,00	20153,00	23,24
N6 INF ESQ	86700,00	19532,00	22,53
Média	86700,00	19918,75	22,97
MÉDIA		19539,63	22,54

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

Tabela 14 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em porcentagem, dos animais do grupo da goma arábica (VII).

Grupo VII	Área selecionada	Área Vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	20659,00	23,83
N1 SUP ESQ	86700,00	19961,00	23,02
N1 INF ESQ	86700,00	20050,00	23,13
Média	86700,00	20223,33	23,33
N2 SUP DIR	86700,00	18537,00	21,38
N2 SUP ESQ	86700,00	19565,00	22,57
N2 INF DIR	86700,00	19718,00	22,74
N2 INF ESQ	86700,00	20209,00	23,31
Média	86700,00	19507,25	22,50
N3 SUP DIR	86700,00	20230,00	23,33
N3 SUP ESQ	86700,00	19138,00	22,07
N3 INF DIR	86700,00	20187,00	23,28
N3 INF ESQ	86700,00	19426,00	22,41
Média	86700,00	19745,25	22,77
N4 SUP DIR	86700,00	20222,00	23,32
N4 SUP ESQ	86700,00	19893,00	22,94
N4 INF DIR	86700,00	18891,00	21,79
N4 INF ESQ	86700,00	20322,00	23,44
Média	86700,00	19832,00	22,87
N5 SUP DIR	86700,00	19543,00	22,54
N5 SUP ESQ	86700,00	19840,00	22,88
N5 INF DIR	86700,00	19438,00	22,42
N5 INF ESQ	86700,00	19762,00	22,79
Média	86700,00	19645,75	22,66
N6 SUP DIR	86700,00	19598,00	22,60
N6 SUP ESQ	86700,00	20238,00	23,34
N6 INFDIR	86700,00	20131,00	23,22
N6 INF ESQ	86700,00	19917,00	22,97
Média	86700,00	19971,00	23,03
N7 SUP DIR	86700,00	20291,00	23,40
N7 SUP ESQ	86700,00	20431,00	23,57
N7 INF DIR	86700,00	21038,00	24,27
N7 INF ESQ	86700,00	21988,00	25,36
Média	86700,00	20937,00	24,15
MÉDIA		19980,23	23,05

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

Tabela 15 – Valores da área vascular de cada quadrante, expresso em pixels e em porcentagem, dos animais do grupo da água (VIII).

Grupo VIII	Área selecionada	Área Vascular (px)	%
N1 SUP DIR	86700,00	20985,00	24,20
N1 SUP ESQ	86700,00	20112,00	23,20
N1 INF DIR	86700,00	20223,00	23,33
N1 INF ESQ	86700,00	19606,00	22,61
Média	86700,00	20231,50	23,34
N2 SUP DIR	86700,00	18919,00	21,82
N2 SUP ESQ	86700,00	18786,00	21,67
N2 INF DIR	86700,00	20408,00	23,54
N2 INF ESQ	86700,00	19120,00	22,05
Média	86700,00	19308,25	22,27
N3 SUP DIR	86700,00	19823,00	22,86
N3 SUP ESQ	86700,00	20846,00	24,04
N3 INF DIR	86700,00	19088,00	22,02
N3 INF ESQ	86700,00	19315,00	22,28
Média	86700,00	19768,00	22,80
N4 SUP DIR	86700,00	20178,00	23,27
N4 SUP ESQ	86700,00	20348,00	23,47
N4 INF DIR	86700,00	20942,00	24,15
N4 INF ESQ	86700,00	20144,00	23,23
Média	86700,00	20403,00	23,53
N5 SUP DIR	86700,00	20458,00	23,60
N5 SUP ESQ	86700,00	18594,00	21,45
N5 INF DIR	86700,00	19525,00	22,52
N5 INF ESQ	86700,00	19694,00	22,72
Média	86700,00	19567,75	22,57
N6 SUP DIR	86700,00	19047,00	21,97
N6 SUP ESQ	86700,00	19524,00	22,52
N6 INF DIR	86700,00	20849,00	24,05
N6 INF ESQ	86700,00	19613,00	22,62
Média	86700,00	19758,25	22,79
N7 SUP DIR	86700,00	20918,00	24,13
N7 SUP ESQ	86700,00	19824,00	22,87
N7 INF DIR	86700,00	19223,00	22,17
N7 INF ESQ	86700,00	18087,00	20,86
Média	86700,00	19513,00	22,51
MÉDIA		19792,82	22,83

Fonte: Próprio autor.

SUP DIR – quadrante superior direito; SUP ESQ – quadrante superior esquerdo; INF DIR – quadrante inferior direito; INF ESQ – quadrante inferior esquerdo.

APÊNDICE D – ÁREA E PERÍMETRO TUMORAL

Tabela 16 – Valores da área e perímetro tumoral de cada animal do estudo dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII.

Grupo/valores	Área (mm²)	Perim (mm)	Grupo/valores	Área (mm²)	Perim (mm)
GI N1	134,53	142,08	GV N1	372,50	125,24
GI N2	89,13	45,17	GV N2	107,73	44,80
GI N3	30,47	58,32	GV N3	149,19	87,62
GI N4	28,86	49,57	GV N4	114,90	69,98
GI N5	32,29	36,26	GV N5	101,73	83,65
GI N6	70,74	87,98	GV N6	78,34	50,18
			GV N7	15,37	40,76
Média	64,34	69,90	Média	134,25	71,75
GII N1	46,40	44,96	GVI N1	108,13	52,86
GII N2	486,51	175,49	GVI N2	53,38	42,63
GII N3	102,83	102,74	GVI N3	71,45	67,42
GII N4	85,05	96,99	GVI N4	112,84	72,78
GII N5	60,07	70,87	GVI N5	80,78	52,80
GII N6	90,23	108,34	GVI N6	56,33	45,22
Média	145,18	99,90	Média	80,49	55,62
GIII N1	47,84	53,87	GVII N1	62,80	104,87
GIII N2	349,03	164,82	GVII N2	112,02	103,92
GIII N3	77,61	55,51	GVII N3	63,16	105,46
GIII N4	75,58	78,69	GVII N4	125,17	111,41
GIII N5	47,52	48,91	GVII N5	57,78	60,94
GIII N6	125,98	90,94	GVII N6	77,17	110,28
			GVII N7	75,33	110,15
Média	120,59	82,12	Média	81,92	101,00
GIV N1	126,15	67,54	GVIII N1	110,68	76,82
GIV N2	195,12	105,56	GVIII N2	34,01	63,64
GIV N3	186,00	74,07	GVIII N3	112,32	77,18
GIV N4	153,99	87,47	GVIII N4	55,38	43,31
GIV N5	274,45	116,22	GVIII N5	103,68	74,21
GIV N6	266,39	134,35	GVIII N6	37,95	54,70
			GVIII N7	57,86	86,63
Média	200,35	97,53	Média	73,12	68,07

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE E – PESO CORPORAL

Tabela 17 - Peso corporal individual semanal dos animais dos grupos da própolis (I), L-lisina (II), goma arábica (III) e água (IV).

Grupo/Semana	1º (inóculo)	2º	MORTE
GI N1	179,00	187,50	189,00
GI N2	188,00	190,00	190,00
GI N3	177,00	184,00	183,50
GI N4	193,50	197,00	198,50
GI N5	229,50	232,00	232,00
GI N6	170,50	170,00	173,00
MÉDIA	189,58	193,42	194,33
GII N1	141,50	146,00	150,00
GII N2	153,50	156,00	159,50
GII N3	129,00	139,00	154,50
GII N4	122,00	137,50	152,00
GII N5	121,00	131,00	142,00
GII N6	124,00	135,50	146,00
MÉDIA	131,83	140,83	150,67
GIII N1	147,50	153,00	159,00
GIII N2	190,00	195,00	196,50
GIII N3	171,50	179,00	182,50
GIII N4	152,00	159,00	162,00
GIII N5	162,00	165,00	168,00
GIII N6	171,50	180,50	184,00
MÉDIA	165,75	171,92	175,33
GIV N1	191,00	219,00	198,50
GIV N2	220,00	222,00	225,00
GIV N3	216,00	221,00	220,00
GIV N4	156,00	176,00	168,00
GIV N5	166,50	197,00	179,00
GIV N6	153,50	157,00	157,00
MÉDIA	183,83	198,67	191,25

Fonte: Próprio autor.

Tabela 18 - Peso corporal individual semanal dos animais dos grupos da própolis (V), L-lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII).

Grupo/Semana	1º	2º	3º	4º	5º (inóculo)	6º	MORTE
GV N1	119,00	130,50	136,00	140,00	147,00	150,00	158,50
GV N2	104,00	110,50	115,00	125,50	129,00	132,00	143,50
GV N3	113,00	122,50	129,50	140,00	145,00	146,00	156,00
GV N4	121,00	137,50	148,00	160,00	169,00	178,00	186,50
GV N5	108,00	114,50	117,50	132,00	124,00	123,00	132,00
GV N6	109,00	121,00	127,00	135,00	136,50	142,00	151,50
GV N7	107,00	114,50	122,00	130,00	140,00	145,00	153,50
MÉDIA	111,57	121,57	127,86	137,50	141,50	145,14	154,50
GVI N1	109,00	120,50	129,00	139,00	145,00	147,50	162,00
GVI N2	106,00	113,00	114,00	121,00	127,00	129,00	145,00
GVI N3	110,00	124,50	131,00	140,00	144,50	148,00	157,00
GVI N4	109,00	121,00	128,00	140,00	148,00	152,00	165,50
GVI N5	111,00	120,50	127,50	130,00	147,00	147,50	164,00
GVI N6	112,00	124,00	132,00	145,00	157,00	161,50	176,00
MÉDIA	109,50	120,58	126,92	135,83	144,75	147,58	161,58
GVII N1	100,50	108,00	115,00	121,50	128,00	131,50	131,00
GVII N2	113,00	121,00	136,00	142,50	148,00	145,50	156,00
GVII N3	114,50	125,50	135,00	142,50	147,50	152,00	156,00
GVII N4	95,50	100,50	111,00	112,50	112,00	118,50	122,50
GVII N5	96,00	103,50	115,00	126,50	130,00	128,50	134,00
GVII N6	92,50	97,00	95,00	106,50	112,00	123,00	128,50
GVII N7	109,50	119,50	127,00	127,00	131,00	134,00	142,00
MÉDIA	103,07	110,71	119,14	125,57	129,79	133,29	138,57
GVIII N1	101,00	109,50	119,00	123,50	131,00	136,00	144,50
GVIII N2	87,00	92,00	93,00	96,00	98,00	98,00	105,00
GVIII N3	112,50	123,50	132,00	136,00	136,00	137,50	138,50
GVIII N4	103,50	110,50	112,00	115,00	121,00	121,50	128,50
GVIII N5	109,00	120,00	129,00	132,00	138,50	142,50	150,50
GVIII N6	91,50	97,00	94,00	111,00	118,00	121,50	126,50
GVIII N7	99,50	103,50	109,00	111,00	118,50	119,00	122,50
MÉDIA	100,57	108,00	112,57	117,79	123,00	125,14	130,86

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE F – PESO DO PULMÃO, FÍGADO E BAÇO

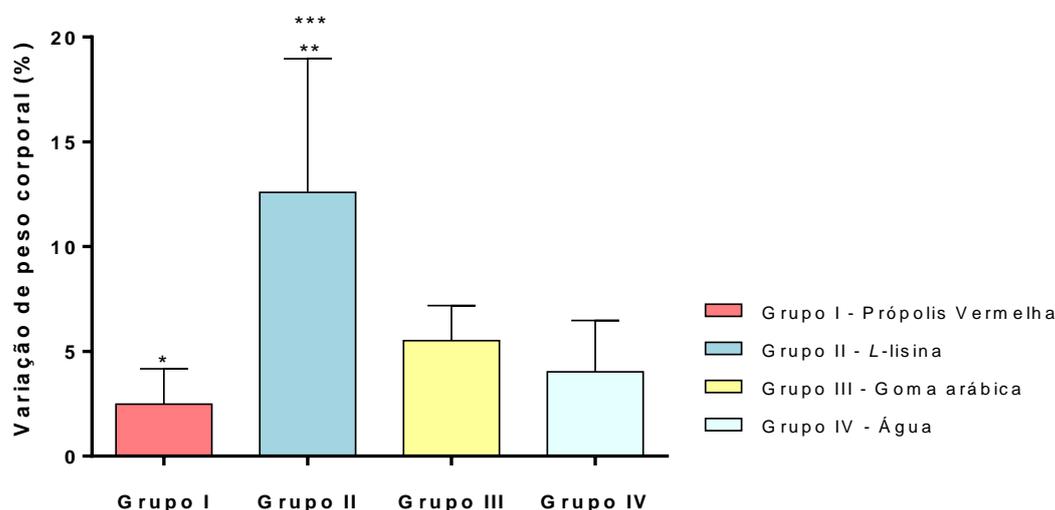
Tabela 19 - Peso do pulmão, fígado e baço individual dos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, no último dia de experimento.

Grupos/ Órgãos	Pulmão	Fígado	Baço	Grupos/ Órgãos	Pulmão	Fígado	Baço
GI N1	0,99	5,96	0,45	GV N1	0,99	6,64	0,37
GI N2	1,08	6,30	0,58	GV N2	0,70	5,58	0,35
GI N3	0,93	5,71	0,49	GV N3	0,91	5,56	0,34
GI N4	0,94	5,47	0,64	GV N4	0,92	7,97	0,44
GI N5	0,99	5,96	0,45	GV N5	0,72	5,15	0,23
GI N6	1,22	7,88	0,51	GV N6	0,92	6,65	0,34
				GV N7	1,05	5,94	0,41
MÉDIA	1,03	6,21	0,52	MÉDIA	0,89	6,21	0,35
GII N1	0,94	5,54	0,45	GVI N1	1,03	7,19	0,48
GII N2	0,61	5,25	0,38	GVI N2	1,13	5,74	0,35
GII N3	0,95	6,40	0,29	GVI N3	0,94	6,28	0,39
GII N4	0,85	6,39	0,37	GVI N4	0,99	8,05	0,42
GII N5	0,79	5,98	0,35	GVI N5	1,33	7,48	0,36
GII N6	0,74	6,27	0,26	GVI N6	0,96	7,92	0,54
MÉDIA	0,81	5,97	0,35	MÉDIA	1,06	7,11	0,42
GIII N1	1,14	4,11	0,32	GVII N1	0,97	5,50	0,63
GIII N2	1,27	5,41	0,66	GVII N2	1,17	6,08	0,80
GIII N3	1,11	5,51	0,66	GVII N3	1,27	6,35	0,68
GIII N4	0,94	5,86	0,34	GVII N4	1,01	5,64	0,69
GIII N5	1,22	4,50	0,51	GVII N5	0,85	5,71	0,75
GIII N6	1,03	4,53	0,41	GVII N6	0,99	5,02	0,46
				GVII N7	0,98	6,83	0,31
MÉDIA	1,12	4,99	0,48	MÉDIA	1,03	5,88	0,62
GIV N1	0,86	5,80	0,47	GVIII N1	1,02	6,00	0,66
GIV N2	1,42	6,11	0,51	GVIII N2	0,80	4,26	0,35
GIV N3	0,71	4,93	0,30	GVIII N3	1,02	4,80	0,39
GIV N4	0,76	5,70	0,29	GVIII N4	0,88	4,53	0,38
GIV N5	0,80	7,57	0,61	GVIII N5	1,07	7,09	0,48
GIV N6	1,14	6,22	0,44	GVIII N6	0,99	4,62	0,35
				GVIII N7	0,76	5,22	0,42
MÉDIA	0,95	6,06	0,44	MÉDIA	0,93	5,22	0,43

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE G – VARIAÇÃO DE PESO

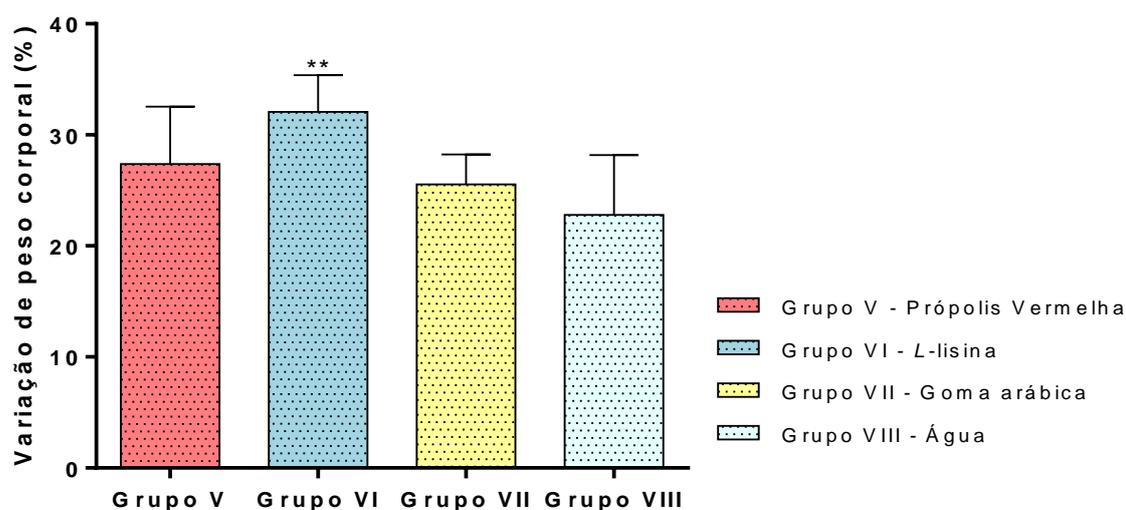
Figura 20 - Variação de peso corporal, em termos percentuais, dos grupos I, II, III e IV, tratados por dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

A variação de peso corporal do grupo I $(p < 0,0005)$ foi significativamente menor que do grupo II e a variação de peso corporal do grupo II foi significativamente maior que do grupo III $(p < 0,01)$ e significativamente maior que do grupo IV $(p < 0,005)$.

Figura 21 – Variação de peso corporal, em termos percentuais, dos grupos V, VI, VII e VIII, tratados por 33 dias antes e dez dias após o inóculo tumoral.



Fonte: Próprio autor.

A variação de peso corporal do grupo VI (6 animais) $(p < 0,005)$ foi significativamente maior que do grupo VIII (7 animais).

APÊNDICE H – INGESTA DE SUBSTÂNCIAS

Tabela 20 – Média de ingesta semanal dos grupos da própolis (I), L-lisina (II), goma arábica (III) e água (IV).

Grupo/semana	1º (inóculo)	2º	MÉDIA
G I	37,92	37,92	37,92
G II	19,78	21,13	20,45
G III	0,83	0,86	0,84
G IV	0,92	0,99	0,96

Fonte: Próprio autor.

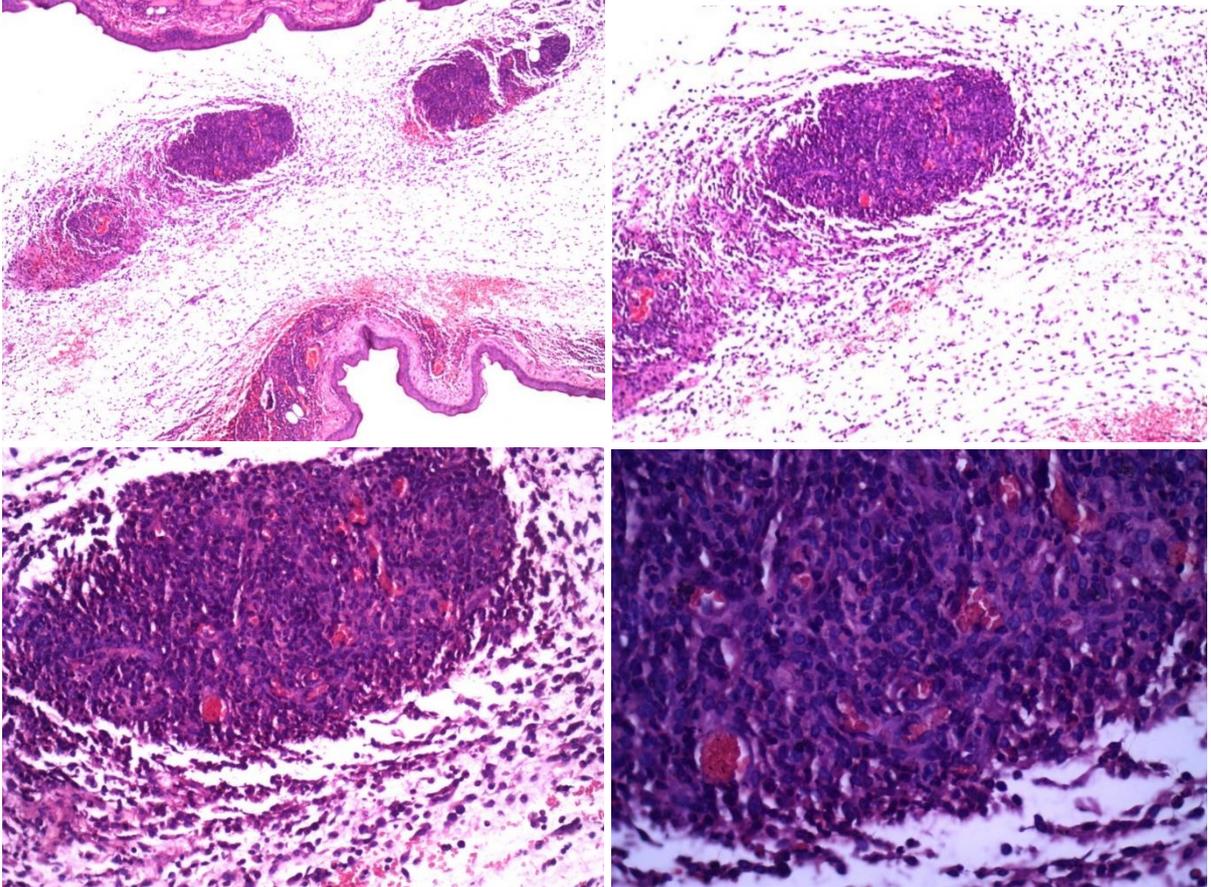
Tabela 21 - Média de ingesta semanal dos grupos da própolis (V), L-lisina (VI), goma arábica (VII) e água (VIII).

Grupo/Semana	1º	2º	3º	4º	5º (inóculo)	6º	MÉDIA
G V	22,31	24,31	25,57	27,50	28,30	29,03	26,17
G VI	16,43	18,09	19,04	20,38	21,71	22,14	19,63
G VII	0,52	0,55	0,60	0,63	0,65	0,67	0,60
G VIII	0,50	0,54	0,56	0,59	0,62	0,63	0,57

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE I – HISTOLOGIA DE CARCINOSSARCOMA DE WALKER EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER

Figura 22 - Carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster.



Fonte: Próprio autor.

(Hematoxilina & Eosina; aumento 50x, 100x, 200x, 400x).

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA- UFC)



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ANGIOGÊNESE EM TUMOR WALKER IMPLANTADO EM BOLSA JULGAL DE HAMSTER TRATADO COM L-LISINA E PRÓPOLIS VERMELHA”, protocolo nº 89/2015, sob responsabilidade da Profa. Dra. Conceição Aparecida Dorneles, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 08 de maio de 2016

Vigência do projeto	Maio/2016 a janeiro/2017
Espécie/Linhagem	Hamster
Nº de Animais	24
Peso/Idade	120g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 08 de maio de 2016


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula SIApe: 1520734

ANEXO B – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA L-LISINA

Lote : 15116558-000387 Origem : China Fabric : 05/06/2015
 Lote Fab: 150605024 Procedência : China Validade : 04/06/2017
 Formula : C6 H14 N2 O2.HCl PM : 182,85 Frac : 367 22/01/2015
 DCB : 05350 CAS : 657-27-2

CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.1.01284-7 Página 001/01
 Aut.Especial de Funcionamento M.S.1.10238-0 Impressão 07/04/16 12:53
 Insu: L-LISINA HCL NF. 137.333 de 07/02/15

Ensaio	Especificação	Resultado	Referência
* DESCRIÇÃO	PÓ BRANCO, INODORO	CONFORME	USP - 36
* SOLUBILIDADE	FACILMENTE SOLÚVEL EM ÁGUA	CONFORME	USP - 36
* IDENTIFICAÇÃO	IV - O ESPECTRO DA AMOSTRA ESTÁ DE ACORDO COM O DO PADRÃO	CONFORME	USP - 36
* PERDA POR DESSECACÃO	MÁXIMO: 0,4% (3 HORAS/105°C)	0,31%	USP - 36
* ROTAÇÃO ESPECÍFICA	+20,4° A +21,4°	+20,53°	USP - 36
* METAIS PESADOS	MÁXIMO: 15 ppm	< 15 ppm	USP - 36
* RESÍDUO POR IGNIÇÃO	MÁXIMO: 0,1%	0,03%	USP - 30
* CONTEÚDO DE CLORETO	19,0% A 19,6%	19,43%	USP - 36
* COMPOSTOS RELACIONADOS (CCD)	IMPUREZA INDIVIDUAL: MÁXIMO 0,5%	NÃO DETECTADO	USP - 36
* COMPOSTOS RELACIONADOS (CCD)	IMPUREZA TOTAL: MÁXIMO 2,0%	NÃO DETECTADO	USP - 36
* SULFATO	MÁXIMO: 0,03%	< 0,03%	USP - 36
* FERRO	MÁXIMO: 30 ppm	< 30 ppm	USP - 36
* TEOR	98,5% - 101,5% (BASE ANIDRA)	100,54%	USP - 36
* DENSIDADE APARENTE	INFORMATIVO (SEM COMPACTAÇÃO)	0,50 g/mL	MET. GERAL F1 V
* pH	5,0 - 6,5	5,80	FABRICANTE
NOMENCLATURA	L-LISINA HCL		

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, ADEQUADO AO CALOR E UMIDADE.

OBS: (*) Os ensaios descritos foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA, CNPJ nº 44.010.477/0001-14 e os demais ensaios foram realizados conforme o Certificado de Análise de Fabricação.

DATA DE EMISSÃO: 21/06/15
 ASSINATURA: _____
 DATA DE RECEBIMENTO: 08/06/15
 ASSINATURA: _____
 DATA DE RECEBIMENTO: 08/06/15
 ASSINATURA: _____
 DATA DE RECEBIMENTO: _____
 ASSINATURA: _____
 DATA DE RECEBIMENTO: _____
 ASSINATURA: _____

Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales
 Farmacêutica Responsável Técnica
 CRF-SP:65.711

Aprovado
 Reprovado

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA R. José Serrão Rodrigues Aguiar, 1370 Fone: 11 4785-5900
 Cap. 06833-300 Centro Log. Enbu - SP www.fagron.com.br

ANEXO D – COMPOSIÇÃO E OUTRAS INFORMAÇÕES DA RAÇÃO CONSUMIDA PELOS ANIMAIS

RAÇÃO NUVILAB CR-1 IRRADIADA

Composição básica do produto: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, óleo vegetal, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato D cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

Níveis de garantia por quilograma do produto: umidade (máx): 125g/kg; proteína bruta (min): 220g/kg; extrato etéreo (min): 50g/kg; material mineral (máx): 90g/kg; fibra bruta (máx): 70g/kg; cálcio (mín-máx): 10-14 g/kg; e fósforo; 6.000 mg/kg.

Vitaminas: A (min) 13.000 ui/kg; vitamina D3 (min) 2.000 ui/kg, vitamina E (min) 34 ui/kg; vitamina D3 (min) 3mg/kg; vitamina B1 (min)5 mg/kg; vitamina B2 (min) 6mg/Kg; vitamina B6 (min) 7 mg/kg; vitamina B12 (min) 22 mg/kg; niacina (min) 60 mg/kg; pantoteno de cálcio (min) 21 mg/kg; ácido fólico (min) 1mg/kg; biotina (min) 0,05mg/kg; colina 1.900 mg/kg.

Minerais: sódio (min) 2700 mg/kg; ferro (min) 50mg/kg; manganês (min) 60mg/kg; zinco (min) 60mg/kg; cobre (min) 10mg/kg; iodo (min) 2mg/kg; selênio (min) 0,05mg/kg; cobalto (min) 1,5 mg/kg, flúor (máx) 60mg/kg.

Aminoácidos: lisina (min) 12g/kg, metionina (min) 4.000mg/kg, aditivos BHT 100,00mg/kg.

Indicação: ração irradiada para camundongos e ratos de laboratório

Uso: administração à vontade em comedouros suspensos

Conservação: conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando luz e calor excessivos.