

#### Como citar este artigo:

Juanes CC, Souza SM, Braga VN, Barreto FS, Aguiar GR, Pimentel KD, et al. Própolis vermelha e L-lisina na angiogênese e no crescimento tumoral em novo modelo de bolsa jugal de hamster inoculada com células de tumor de Walker 256. *einstein* (São Paulo). 2019;17(2):eAO4576. [http://dx.doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2019AO4576](http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4576)

#### Autor correspondente:

Camila de Carvalho Juanes  
Rua Monsenhor Furtado, s/n – Rodolfo Teófilo  
CEP: 60441-750 – Fortaleza, CE, Brasil  
Tel.: (85) 3366-8304  
E-mail: [camilajuanes@gmail.com](mailto:camilajuanes@gmail.com)

#### Data de submissão:

15/5/2018

#### Data de aceite:

3/12/2018

#### Conflitos de interesse:

não há.

#### Copyright 2019



Esta obra está licenciada sob  
uma Licença *Creative Commons*  
Atribuição 4.0 Internacional.

## ARTIGO ORIGINAL

# Própolis vermelha e L-lisina na angiogênese e no crescimento tumoral em novo modelo de bolsa jugal de hamster inoculada com células de tumor de Walker 256

Red propolis and L-lysine on angiogenesis and tumor growth in a new model of hamster cheek pouch inoculated with Walker 256 tumor cells

Camila de Carvalho Juanes<sup>1</sup>, Susana Moreira de Souza<sup>1</sup>, Vanessa Nogueira Lages Braga<sup>1</sup>, Francisco Stefânio Barreto<sup>1</sup>, Gisele Rocha Aguiar<sup>1</sup>, Kleison Douglas Gomes Pimentel<sup>1</sup>, Francisco Vagnaldo Fachine<sup>1</sup>, Conceição Aparecida Dornelas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

DOI: [10.31744/einstein\\_journal/2019AO4576](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4576)

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito da própolis vermelha e da L-lisina na angiogênese e no crescimento tumoral em novo modelo de bolsa jugal de hamster inoculada com células de tumor de Walker 256.

**Métodos:** O estudo consistiu em dois experimentos com quatro grupos cada (total: 57 hamsters). No experimento 1, os animais foram inoculados com células de tumor de Walker, tendo em seguida administradas as substâncias teste (própolis vermelha 200mg/5mL/kg ou L-lisina 150mg/kg) ou controle (goma arábica 5mL/kg ou água 5mL/kg) por 10 dias. Os animais do experimento 2 receberam própolis vermelha, L-lisina, goma arábica ou água nas mesmas doses, por 33 dias antes do inóculo das células de tumor de Walker, seguido por 10 dias de tratamento com as mesmas substâncias. Baseado em imagens em plano único, foram quantificados a angiogênese (área vascular média), em termos percentuais, e a área (mm<sup>2</sup>) e o perímetro (mm) do tumor.

**Resultados:** Comparada aos animais que receberam água, a área vascular média, expressa em porcentagem, foi significativamente menor nos animais tratados com própolis ( $p < 0,05$ ) e com L-lisina ( $p < 0,001$ ). **Conclusão:** Tanto a própolis vermelha quanto a L-lisina inibiram a angiogênese no novo modelo de bolsa jugal de hamsters, quando administradas após a inoculação do tumor.

**Descritores:** Neovascularização fisiológica; Própole; Lisina; Carcinoma 256 de Walker; *Cricetinae*

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effect of red propolis and L-lysine on angiogenesis and tumor growth in a new model of hamster cheek pouch inoculated with Walker 256 tumor cells. **Methods:** The study consisted of two experiments with four groups each (total: 57 hamsters). In the experiment 1, the animals were inoculated with Walker tumor cells, followed by administration of test substances (red propolis 200mg/5mL/kg or L-lysine 150mg/kg) or control substances (gum arabic 5mL/kg or water 5mL/kg) for 10 days. The animals in the experiment 2 received red propolis, L-lysine, gum arabic or water at the same doses, for 33 days prior to inoculation of Walker tumor cells, followed by 10 days of treatment with the same substances. Based on single-plane images, angiogenesis was quantified (mean vascular area), in percentage, and tumor area (mm<sup>2</sup>) and perimeter (mm).

**Results:** In the experiment 1, compared to animals receiving water, the mean vascular area

expressed in percentage was significantly smaller in animal treated with propolis ( $p < 0.05$ ) and *L*-lysine ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** Both red propolis and *L*-lysine inhibited tumor angiogenesis in the new hamster cheek pouch model when administered after tumor inoculation.

**Keywords:** Neovascularization, physiologic; Propolis; Lysine; Carcinoma 256, Walker; *Cricetinae*

## INTRODUÇÃO

A angiogênese (ou neovascularização) é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes.<sup>(1)</sup> Em 1970, Folkman abriu perspectivas para a terapia do câncer, ao sugerir que o crescimento tumoral estava relacionado à neovascularização e dela dependia. A subsequente descoberta dos primeiros inibidores endógenos da angiogênese confirmou sua hipótese e deu origem a uma busca frenética por novos modelos para o estudo da angiogênese e por compostos antiangiogênicos entre as moléculas sabidamente presentes em produtos derivados da biodiversidade. Paralelamente, a indústria farmacêutica desenvolveu vários inibidores da angiogênese, beneficiando milhares de pacientes. No entanto, devido à complexidade do câncer, do crescimento tumoral e da angiogênese, muitas drogas comercialmente disponíveis são eficazes apenas contra certos tipos de tumor.<sup>(2)</sup>

A própolis vermelha brasileira, uma substância resinosa e insolúvel em água, produzida a partir da mistura de saliva de abelhas (*Apis mellifera*) e do exsudato de certas plantas, principalmente de *Dalbergia ecastaphyllum* (*L.*) *Taub.*,<sup>(3)</sup> tem forte atividade antioxidante, e tem sido investigada e proposta como um inibidor da angiogênese.<sup>(4,5)</sup> A *L*-lisina é um aminoácido essencial que se mostrou capaz de promover a carcinogênese<sup>(6)</sup> e estimular a angiogênese em câncer de bexiga induzido.<sup>(7)</sup>

Em vários modelos de implante tumoral, utilizam-se células do tumor de Walker.<sup>(8)</sup> A bolsa jugal de hamster (*Mesocricetus auratus*)<sup>(9,10)</sup> é um tecido adequado para um novo modelo, tendo em vista que a membrana facilita a visualização de vasos. O modelo de implante em bolsa jugal de hamster descrito na literatura valia-se da inoculação de fragmentos tumorais, e não de células.<sup>(9)</sup> Em nosso modelo experimental, um número padronizado de células tumorais foram inoculadas no intuito de promover maior consistência no crescimento tumoral entre os indivíduos, obtendo-se resultados mais confiáveis.

Vários estudos avaliaram a atividade imunomoduladora da própolis. Dornelas et al.,<sup>(6)</sup> observaram inibição da carcinogênese em animais submetidos a 30 dias de tratamento com própolis, antes da aplicação do carcinógeno. O papel do sistema imune no desenvolvimento da neoplasia está bem documentado, e sabe-se que o

perfil imunológico individual determina o prognóstico de pacientes com câncer. Assim, os compostos imunomoduladores podem ser úteis no tratamento do câncer. A ativação de complemento, linfócitos e macrófagos foi observada em muitos estudos, sugerindo que isso faz parte do mecanismo pelo qual a própolis induz a apoptose em células tumorais.<sup>(11-13)</sup> Dessa forma, incluímos um experimento com 33 dias de tratamento com própolis antes do inóculo tumoral (experimento 2).

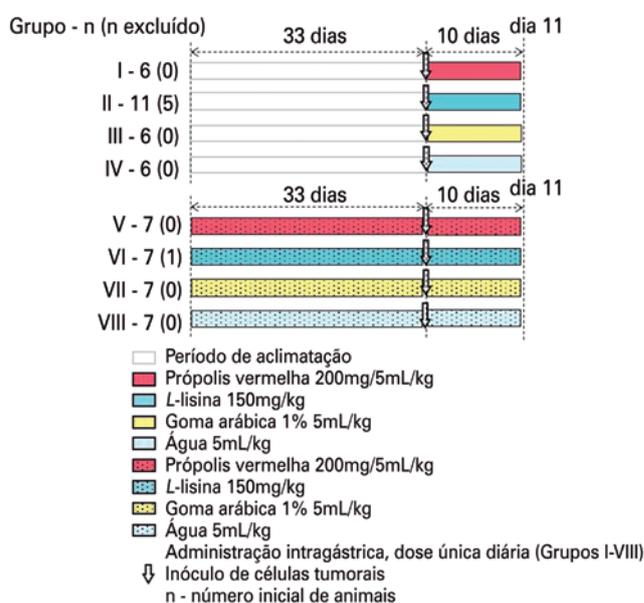
## OBJETIVO

Avaliar o efeito da própolis vermelha e da *L*-lisina na angiogênese e no crescimento tumoral em um novo modelo de bolsa jugal de hamster inoculada com células de tumor de Walker 256.

## MÉTODOS

### Protocolo de estudo

O protocolo de estudo seguiu as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e foi aprovado (protocolo 89/2015) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). O experimento envolveu 57 hamsters (*Mesocricetus auratus*) fêmeas, com 120 dias de idade. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, a 25°C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a alimento e água *ad libitum*. Seis animais foram excluídos, resultando em amostra final de 51 animais. A figura 1 mostra o desenho experimental.



**Figura 1.** Desenho do estudo. Experimento 1 incluiu Grupos I-IV e experimento 2, Grupos V-VIII

### Preparação e administração de medicamentos

O monoclórato de L-lisina ( $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ , CAS#657-27-2, FAGRON, China) foi diluído em água destilada e administrado por gavagem oral, na dose de 150mg/kg.<sup>(6,7)</sup>

A própolis vermelha *in natura* foi adquirida de fornecedor idôneo, em Barra de Santo Antônio (Alagoas, Brasil), e submetida à extração em etanol 95%, a temperatura ambiente. Depois da evaporação do etanol, o extrato resultante foi armazenado a 4°C e, posteriormente, diluído em goma arábica a 1%,<sup>(14)</sup> a aproximadamente 60°C, sendo administrado por gavagem oral na dose de 200mg/5mL/kg.

A goma arábica (CAS#9000-01-5, Dinâmica Química Contemporânea LTDA.) foi diluída em água destilada a 1% e administrada por gavagem oral na dose de 5mL/kg.

### Células do tumor de Walker 256 e inóculo em bolsa jugal de hamster

As células tumorais foram fornecidas pelo Laboratório Nacional de Oncologia Experimental. Após anestesia com administração intraperitoneal de cloridrato de cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), a bolsa jugal esquerda foi evertida e lavada com solução fisiológica. Uma solução de 0,1mL de Ringer com lactato e gentamicina (na proporção de 50:1), contendo  $1,2 \times 10^6$  células do tumor de Walker, foi injetada no subepitélio, com agulha hipodérmica e seringa de insulina. Para evitar contato com vasos linfáticos, o inóculo foi aplicado no centro da bolsa jugal, a uma distância segura das fibras do músculo retrator (Figura 2).

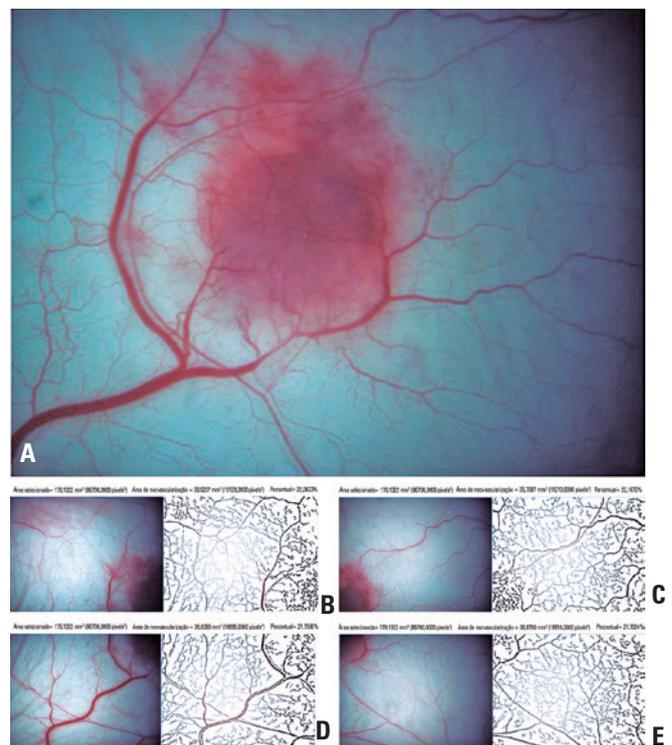


**Figura 2.** Inóculo de células de tumor de Walker. (A) Bolsa jugal de hamster evertida. (B) Inóculo de células de tumor de Walker em bolsa jugal de hamster

### Quantificação da angiogênese e tamanho do tumor

O tumor foi fotografado no 11º dia após o inóculo tumoral. Para isso, após a anestesia, a bolsa jugal foi evertida e ressecada na base, cauterizando-se os vasos sanguíneos, para evitar a drenagem dos vasos que alimentavam o tumor. A amostra foi, então, fixada em placa de Petri sobre fundo branco. Foram tiradas micrografias panorâmicas (4x, 6x, 10x) e por quadrante (16x) usando-se câmera de vídeo analógica (Hitachi VCC-151, Japão), acoplada a um microscópio estereoscópico (D.F. Vasconcellos S.A., São Paulo, Brasil). As imagens digitais foram armazenadas em um *notebook* com *software* de captura de vídeo (PixelView, ProLink Microsystem Corp., Taiwan).

A angiogênese foi determinada quantificando-se a área vascular média dos quadrantes (imagens 16x), usando-se o Sistema de Quantificação de Angiogênese (SQAN)<sup>(15)</sup> (Figura 3). Os resultados foram expressos em percentagem.



**Figura 3.** Carcinossarcoma de Walker implantado em bolsa de hamster. (A) Visualização panorâmica (10x) do implante de carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster. (B a E) Visualização por quadrante (16x) da área vascular no Sistema de Quantificação de Angiogênese

Com base nas imagens panorâmicas em plano único (4x, 6x e 10x), foram determinadas a área (mm<sup>2</sup>) e o perímetro (mm) do tumor, usando-se o *software* ImageJ (Fiji).<sup>(16)</sup>

### Coleta de órgãos

Os pulmões, o fígado e o baço foram excisados e pesados, após eutanásia (11<sup>o</sup> dia) com *overdose* de anestésicos. Os órgãos coletados foram examinados para verificar a presença de metástases.

### Análise estatística

A normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi verificada com o teste Kolmogorov-Smirnov. Para estatística descritiva, calculamos os valores médios e desvios padrão para todas as variáveis paramétricas. Os grupos dos experimentos 1 (I a IV) e 2 (V a VIII) foram comparados de forma pareada por meio de análise de variância simples (ANOVA) associada ao teste de comparação múltipla de Tukey. Todos os testes foram bicaudais, e o nível de significância estatística foi estabelecido em 5% (p<0,05). Todas as análises foram realizadas com o *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.00.

## RESULTADOS

Durante o experimento, seis animais foram excluídos devido à inoculação inadequada. Nenhuma metástase foi observada nos órgãos coletados. Nenhum animal morreu durante o período do estudo.

O aumento da variação do peso corpóreo foi significativamente maior nos animais tratados com L-lisina em relação aos animais que receberam água (Grupo II 12,59±6,38% versus Grupo IV 4,03±2,44%; p<0,005; Grupo VI 32,06±3,30% versus Grupo VIII 22,78±5,41%; p<0,005). Quanto aos órgãos coletados, a única diferença significativa foi observada no fígado dos animais tratados com L-lisina em comparação com o dos animais que receberam água (Grupo VI 7,11±0,92g versus Grupo VIII 5,22±1,00g; p<0,005).

No experimento 1, a própolis vermelha (Grupo I) e a L-lisina (Grupo II) reduziram significativamente a área vascular média. Os grupos do experimento 2 (V a VIII) não diferiram de forma significativa nesse aspecto (Tabela 1).

**Tabela 1.** Área vascular média (%) dos grupos que receberam própolis, L-lisina, goma arábica e água, por 10 dias após o inóculo tumoral (Grupos I a IV) e por 33 dias antes e 10 dias após o inóculo tumoral (Grupos V a VIII)

Área vascular média (%)	Grupo I Própolis	Grupo II L-lisina	Grupo III Goma arábica	Grupo IV Água	Valor de p (ANOVA)
Média±DP	22,61±0,6*	22,15±0,42 <sup>†</sup>	22,91±0,53	23,47±0,29	0,0015
Área vascular média (%)	Grupo V Própolis	Grupo VI L-lisina	Grupo VII Goma arábica	Grupo VIII Água	Valor de p (ANOVA)
Média±DP	22,58±0,48	22,54±0,34	23,05±0,55	22,83±0,45	0,1958

\* p<0,05 e <sup>†</sup> p<0,001 indicam diferenças significativas em relação ao Grupo IV (teste de Tukey). ANOVA: análise de variância; DP: desvio padrão.

Não houve diferença significativa na área (mm<sup>2</sup>) e no perímetro (mm) do tumor entre os grupos experimentais (Grupos I, II, V e VI) e seus respectivos Grupos Controle (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Área e perímetro tumorais dos grupos que receberam própolis, L-lisina, goma arábica e água por 10 dias após o inóculo tumoral

Tamanho do tumor	Grupo I Própolis Média±DP	Grupo II L-lisina Média±DP	Grupo III Goma arábica Média±DP	Grupo IV Água Média±DP	Valor de p (ANOVA)
Área, mm <sup>2</sup>	64,34±42,46	145,18±168,49	120,59±115,52	200,35±59,57	0,2156
Perímetro, mm	69,90±39,57	99,90±43,96	82,12±43,68	97,54±25,77	0,5180

ANOVA: análise de variância; DP: desvio padrão. Teste de Tukey.

**Tabela 3.** Área e perímetro tumorais dos grupos que receberam própolis, L-lisina, goma arábica e água por 33 dias antes e 10 dias após o inóculo tumoral

Tamanho do tumor	Grupo V Própolis Média±DP	Grupo VI L-lisina Média±DP	Grupo VII Goma arábica Média±DP	Grupo VIII Água Média±DP	Valor de p (ANOVA)
Área, mm <sup>2</sup>	134,25±112,83	80,49±25,34	81,92±26,28	73,13±34,63	0,2713
Perímetro, mm	71,75±30,03	55,62±12,05 <sup>*</sup>	101,00±17,92	68,07±15,02 <sup>†</sup>	0,0035

\* p<0,01 e <sup>†</sup> p<0,05 indicam diferenças significativas em relação ao Grupo VII (teste de Tukey). ANOVA: análise de variância; DP: desvio padrão.

## DISCUSSÃO

O estudo da neovascularização é importante em muitos campos da patologia, especialmente na progressão do câncer. Neste estudo, adaptamos um modelo experimental de bolsa jugal de hamster para o estudo da angiogênese induzida por tumor. Inicialmente, realizamos um estudo piloto para determinar o número mínimo de células do tumor de Walker necessárias para haver crescimento tumoral. Foram tomados cuidados para evitar acidentes, como vazamento da suspensão de células tumorais e inoculação na vizinhança de fibras musculares, e os animais com inoculação inadequada (uma consequência natural da curva de aprendizado) foram excluídos da análise. O índice de pega do tumor nos animais restantes foi de 100%.

A cauterização elétrica dos vasos sanguíneos para impedir sua drenagem e o uso de um fundo branco para a captura de imagens digitais por meio de um microscópio estereoscópico constituem um método novo para a quantificação da angiogênese na bolsa jugal de hamster, mas, como o método exigia a ressecção do tecido da bolsa jugal, a angiogênese não pôde ser monitorada *in vivo*.

Os pesquisadores que utilizaram o modelo da bolsa jugal de hamster para estudar a carcinogênese química

e a neovascularização empregaram marcadores moleculares e cortes histológicos para quantificar a angiogênese,<sup>(10)</sup> mas não utilizam imagens digitais capturadas com microscópio estereoscópico de amostras montadas a fresco. O *software* SQAN foi desenvolvido para quantificar a angiogênese em imagens digitais de tecidos adquiridos *in vivo* usando-se uma câmera acoplada a um microscópio estereoscópico. Considerado rápido e prático, o método foi usado com sucesso em modelo de córnea de coelho.<sup>(15,17)</sup> Esse método foi validado para análise morfométrica da rede vascular em modelos experimentais de câncer.<sup>(18)</sup>

A variação no peso corpóreo foi significativamente maior nos animais tratados com L-lisina (Grupos II e VI) do que nos animais que receberam água. Quanto aos órgãos coletados, a única diferença significativa observada foi no fígado do grupo da L-lisina (Grupo VI) em comparação com o grupo da água (Grupo VIII). O ganho de massa corpórea pela L-lisina é consistente com os dados da literatura.<sup>(19)</sup>

Uma comparação da área vascular média, expressa em percentagem, no experimento 1, mostra que a angiogênese induzida pelo tumor somente foi inibida significativamente nos animais tratados com própolis (Grupo I) e L-lisina (Grupo II). Quando submetida ao método de sequestro de radicais livres para verificar a atividade antioxidante, a própolis vermelha usada neste estudo mostrou atividade antioxidante superior ao padrão da vitamina C. Além disso, foram isolados do extrato etanólico quatro isoflavanos, uma chalcona e um triterpeno. As propriedades antioxidantes da própolis vermelha estão relacionadas à capacidade das chalconas e dos isoflavonoides de doar elétrons.<sup>(20)</sup> O teor total de compostos fenólicos no extrato etanólico foi de 133,3±4,35mg GAE/g de amostra.<sup>(21)</sup> Os níveis de atividade antioxidante e compostos fenólicos observados neste estudo são semelhantes aos de análises anteriores.<sup>(5)</sup> Esses achados justificam o estudo do extrato de própolis vermelha como potencial agente antiangiogênico. Essa ação antioxidante pode atuar tanto dificultando o desenvolvimento do tumor quanto inibindo a angiogênese, uma vez que o estresse oxidativo está por trás da fisiopatologia do câncer.<sup>(22)</sup>

A própolis vermelha produz efeitos antioxidantes, inibe a angiogênese por meio da modulação de fatores angiogênicos e da inflamação, e reduz os níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator induzido por hipóxia (HIF)-1 $\alpha$ .<sup>(23,24)</sup> Também está extensamente documentada a relação entre a angiogênese, o estresse oxidativo e a hipóxia tumoral.<sup>(25)</sup> A correlação entre os efeitos antiangiogênicos e antioxidantes da própolis foi avaliada *in vitro* usando células endoteliais. Não foi surpresa constatar que os compostos mais antiangiogênicos também foram os mais antioxidantes.<sup>(26)</sup>

Poucos estudos foram realizados sobre o efeito da L-lisina na angiogênese. Em um estudo, a L-lisina promoveu a angiogênese em câncer de bexiga induzido quimicamente, quando administrada concomitantemente com o carcinógeno, levando os autores a levantar a hipótese de que a angiogênese possa ter contribuído para o tamanho e a agressividade do tumor.<sup>(7)</sup>

É interessante notar que a área vascular diminuiu muito pouco nos animais que receberam própolis vermelha e L-lisina por 43 dias (pré + pós-inoculação de células do tumor de Walker), no experimento 2, em comparação com os Grupos Controle que receberam água. A angiogênese não foi inibida como nos animais tratados com própolis e L-lisina por 10 dias (experimento 1). Esse achado não é fácil de explicar, mas diferentes estudos encontraram efeitos citotóxicos ou citoprotetores dependendo de as células serem neoplásicas ou normais, e de o experimento ser *in vitro* ou *in vivo*. Mesmo a atividade antioxidante e oxidante pode estar relacionada à dose e ao tempo de administração. Por conseguinte, os efeitos antagônicos podem ser explicados pelos diferentes compostos presentes no produto da própolis, e também pelo estreito limiar entre a dose terapêutica e a dose tóxica.<sup>(27,28)</sup>

Resta ainda confirmar se a própolis vermelha e a L-lisina são adjuvantes adequados a outros inibidores da angiogênese. Até o momento, mesmo os inibidores dos receptores da angiogênese são ineficazes contra muitos tipos de tumores, seja porque os receptores do fator de crescimento tumoral diferem, ou porque a angiogênese é dependente de outras vias além do VEGF, como no câncer de pulmão. Também ainda é preciso determinar se a própolis é eficaz em quadros não neoplásicos, como a psoríase e a endometriose.<sup>(29)</sup>

Não foi observada nenhuma diferença significativa na área e nem no perímetro do tumor entre os grupos experimentais e seus respectivos Grupos Controle. Contudo, as mensurações em plano único somente refletem a superfície do tumor, não levando em conta seu volume total.

A própolis vermelha e seus compostos isolados modulam a progressão da carcinogênese *in vivo*<sup>(30)</sup> e são citotóxicos para linhagens de células tumorais *in vitro*.<sup>(27)</sup> No entanto, um estudo com linhagens de células tumorais revelou que diferentes concentrações de própolis vermelha estão associadas a diferentes perfis de citotoxicidade.<sup>(27)</sup>

A L-lisina, por sua vez, quando administrada concomitantemente com o carcinógeno, promoveu a carcinogênese no câncer de bexiga induzido quimicamente e protegeu contra a genotoxicidade, em medula óssea e em sangue periférico. Porém, os animais que receberam somente L-lisina não desenvolveram câncer. Assim, em-

bora a *L*-lisina tenha uma ação promotora (não genotóxica) na carcinogênese da bexiga, ela não é genotóxica para os leucócitos da medula óssea ou do sangue periférico nas doses testadas em animais.<sup>(6,31)</sup>

Por outro lado, a *L*-lisina não promoveu carcinogênese em um modelo de câncer de bexiga em ratos submetidos a ureterossigmoidostomia e vesicossigmoidostomia.<sup>(32,33)</sup> Entretanto, a *L*-lisina acelerou o desenvolvimento de metaplasia transicional no epitélio intestinal de ratos submetidos à cistoplastia.<sup>(34)</sup>

## CONCLUSÃO

Tanto a própolis vermelha quanto a *L*-lisina inibiram a angiogênese no novo modelo de bolsa jugal de hamster quando administradas após o inóculo do tumor.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo uso do microscópio estereoscópico, e ao Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da UFC, pelo fornecimento de células de tumor de Walker.

Publicação requerida para obtenção de grau de Mestre em Patologia do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Patologia. Aluna: Camila de Carvalho Juanes. Tutor: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas, PhD. Pesquisa realizada no Laboratório de Manuseio de animais, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFC, Fortaleza (CE), Brasil.

## INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Juanes CC: <http://orcid.org/0000-0001-8088-0033>  
 Souza SM: <http://orcid.org/0000-0003-2884-6131>  
 Braga VN: <http://orcid.org/0000-0001-8663-8803>  
 Barreto FS: <http://orcid.org/0000-0003-0528-4551>  
 Aguiar GR: <http://orcid.org/0000-0002-8458-2698>  
 Pimentel KD: <http://orcid.org/0000-0002-2677-0949>  
 Fechine FV: <http://orcid.org/0000-0002-8893-5323>  
 Dornelas CA: <http://orcid.org/0000-0002-1692-086X>

## REFERÊNCIAS

- Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):273-86. Review.
- Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg.* 2007;392(3):371-9.
- Daugusch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008;5(4):435-41.
- Lima Cavendish R, de Souza Santos J, Belo Neto R, Oliveira Paixão A, Valéria Oliveira J, Divino de Araujo E, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2015;173:127-33.
- Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol.* 2013;52:137-42.
- Dornelas CA, Fechine-Jamacaru FV, Albuquerque IL, Magalhães HI, Souza AJ, Alves LA, et al. 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.* 2012;27(2):185-92.
- Dornelas CA, Fechine-Jamacaru FV, Albuquerque IL, Magalhães HI, Dias TA, Faria MH, et al. Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. *Acta Cir Bras.* 2012;27(8):529-36.
- Dornelas CA, Almeida PR, Nascimento GL, Lima EB, Moraes MO. [Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder]. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(1):38-42. Portuguese.
- Smith GM. 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.* 1969;23(1):88-94.
- Zaid KW, Nhar BM, Ghadeer Alanazi SM, Murad R, Domani A, Alhafi AJ. 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.* 2016;17(7):3527-31.
- Orsolić N, Basić I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol.* 2003;84(2-3):265-73.
- Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Biol (São Paulo).* 2008;75(2):247-53.
- Melo NO, Juanes CC, Alves MF, Silva ET, Jamacaru FV, Lemos TL, et al. Effect of red propolis on hamster cheek pouch angiogenesis in a new sponge implant model. *Acta Cir Bras.* 2018;33(5):420-30.
- Bhadauria M, Nirala SK, Shukla S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(8):2703-12.
- Fechine-Jamacaru FV. Quantificação de angiogênese corneana in vivo através de processamento de imagens digitais [tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2006.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82.
- Ribeiro JC, Vagnaldo Fechine F, Ribeiro MZ, Barreiro EJ, Lima LM, Ricardo NM, et al. Potential inhibitory effect of LASSBio-596, a new thalidomide hybrid, on inflammatory corneal angiogenesis in rabbits. *Ophthalmic Res.* 2012;48(4):177-85.
- Fechine-Jamacaru FV. Desenvolvimento e validação de um método para análise morfométrica e fractal da rede vascular peritumoral em modelos experimentais de câncer [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2018.
- Singh M, Roa DM, Pande S, Battu S, Mahalakshmi K, Dutt KR, et al. Medicinal uses of L-lysine: past and future. *Int J Res Pharm Sci.* 2011;2(4):637-42.
- Lemos TL, Aguiar GR, Dornelas CA, Silva AM, Almeida MC, Ferreira DA, et al. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. *Rev Virtual Quim.* 2018;10(1):1-11.
- Aguiar GR. Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2015.
- Vit P, Huq F, Barth OM, Campo M, Pérez-Pérez EM, Tomás-Barberán FA, et al. Use of propolis in cancer research. *BJMMR.* 2015;8(2):88-109.
- Daleprane JB, Schmid T, Dehne N, Rudnicki M, Menrad H, Geis T, et al. Suppression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. *J Nutr.* 2012;142(3):441-7.

24. Daleprane JB, Abdalla DS. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:175135.
25. Dewhirst MW. Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiat Res.* 2009;172(6):653-65.
26. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, et al. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(5):643-51.
27. de Mendonça IC, Porto IC, do Nascimento TG, de Souza NS, Oliveira JM, Arruda RE, et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15(1):357.
28. Oršolić N, Benković V, Lisičić D, Dikić D, Erhardt J, Knežević AH. Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan. *Med Oncol.* 2010;27(4):1346-58.
29. Huang G, Tao L, Shen S, Chen L. Hypoxia induced CCL28 promotes angiogenesis in lung adenocarcinoma by targeting CCR3 on endothelial cells. *Sci Rep.* 2016;6:27152.
30. Ribeiro DR, Alves AV, dos Santos EP, Padilha FF, Gomes MZ, Rabelo AS, et al. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015;117(2):85-95.
31. Dornelas CA, Cavalcanti BC, Magalhães HI, Jamacaru FV, Furtado FN, Juanes CC, et al. 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.* 2014;29(7):423-8.
32. Dornelas CA, Santos AM, Correia AL, Juanes CC, Coelho JP, Cunha BL, et al. Bladder carcinogenesis in rats subjected to ureterosigmoidostomy and treated with L-lysine. *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(2):80-6.
33. Santos AM, Coelho JP, Juanes CC, Azevedo RB, Melo NO, Jamacaru FV, et al. Carcinogenesis in rats subjected to a new model ureterosigmoidostomy and treated with L-lysine. *Acta Cir Bras.* 2016;31(12):793-800.
34. Santos AM, Coelho JP, Juanes CC, Azevedo RB, Diniz CA, Jamacaru FV, et al. Transitional metaplasia in intestinal epithelium of rats submitted to intestinal cystoplasty and treatment with L-lysine. *Acta Cir Bras.* 2017;32(4):297-306.